

# Design, Synthese und Evaluation selektiver Inhibitoren in Modellen der akuten myeloischen Leukämie sowie der Alzheimer Demenz.



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

**Dissertation**

vorgelegt von

**Theresa Neumann, M.Sc.**

aus Fürth (in Bayern)

Referent: Prof. Dr. Boris Schmidt

Korreferentin: Prof. Dr. Katja Schmitz

Tag der Einreichung: 18. Juli 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2016

**Darmstadt 2016**


**D17**





Hinter jedem Hindernis öffnet sich eine ganz neue Freiheit,  
ein viel weiterer Horizont.

*Buddistische Weisheit*



---

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Boris Schmidt in der Zeit von Juni 2013 bis Juni 2016 am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

---

## Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *Boris Schmidt* für die spannende Themenstellung, die engagierte Betreuung dieser Arbeit, die stete Unterstützung sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ich danke allen ehemaligen Kollegen, *Bina, Eva, Parul, Christoph, Stefan* und *Constantin* für das freundliche Arbeitsklima und die schöne gemeinsame Zeit auch außerhalb des Labors.

Ein weiterer Dank gilt den aktiven Mitarbeitern des Arbeitskreises, *Dennis, Daniel* und *Johannes*, für die wunderbaren und produktiven letzten Monate im Viererteam.

*Christoph* danke ich für seine mitreißende positive Art, seine stete Hilfsbereitschaft und für die zahlreichen gemeinsamen Vias-Fahrten.

Ein besonderer Dank gilt *Dennis* für die gemeinsame Zeit während der Minimalbesetzung. Durch gute Teamarbeit, stete Hilfsbereitschaft, fachliche Kompetenz und Freundschaft haben wir trotz Minimalbesetzung nicht nur den Alltag im Arbeitskreis gemeistert sondern auch unsere wissenschaftliche Arbeit vorangebracht.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Studenten für die wertvollen Erfahrungen, die ich durch die Betreuung ihrer Praktika und Abschlussarbeiten sammeln konnte.

Unseren zahlreichen Kooperationspartnern in Boston – *Kimberly Stegmaier* und *Lina Benajiba*, in Berlin – *Peter-Michael Kloetzel* und *Ulrike Kuckelkorn*, am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI in Halle – *Hans-Ulrich Demuth* und *Stefan Schilling* sowie in London – *Frances Edwards* und *Damian Cummings* danke ich für den wertvollen fachlichen Austausch und gute Zusammenarbeit.

*Paul Fish* und *Paul Whiting* vom University College in London danke ich für ihr großes Interesse an meinen GSK-3 $\alpha$  Inhibitoren sowie dem zukünftigen Voranbringen des Projekts.

Ich danke *Dennis, Daniel* und *Patrick* für die gewissenhafte Korrektur dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meiner Schwester *Franziska* für ihre permanente Unterstützung und Motivation während meines gesamten Studiums und der Promotion. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

*Patrick* danke ich für einfach Alles!

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen vorgestellt und veröffentlicht:

- Theresa Neumann, Lina Benajiba, Stefan Göring, Kimberly Stegmaier, Boris Schmidt, "Evaluation of Improved Glycogen Synthase Kinase-3 $\alpha$  Inhibitors in Models of Acute Myeloid Leukemia", *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58 (22), 8907-8919.
- Dennis Bensinger, Theresa Neumann, Christoph Scholz, Constantin Voss, Sabine Knorr, Ulrike Kuckelkorn, Kay Hamacher, Peter M. Kloetzel, Boris Schmidt, "Elastase-like activity is dominant to Chymotrypsin-like activity in 20S Proteasome's  $\beta 5$  catalytic subunit.", *ACS Chemical Biology* **2016**, DOI: 10.1021/acschembio.6b00023.

### Posterbeiträge

- Theresa Neumann, Fabio LoMonte, Thomas und Boris Schmidt, „Scorpion shaped glycogen synthase kinase-3 inhibitors versus Tivantinib.“, *9<sup>th</sup> Status Seminar Chemical Biology - ChemBioNet*, Frankfurt, **21.-22.01.2014**.
- Theresa Neumann, Lina Benajiba, Stefan Göring, Kimberly Stegmaier, Boris Schmidt, "Evaluation of Improved Glycogen Synthase Kinase-3 $\alpha$  Inhibitors in Models of Acute Myeloid Leukemia", *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Bonn, **13.-16.03.2016**.

Danksagung.....	iv
Veröffentlichungen.....	v
Inhaltsverzeichnis .....	vi
Abkürzungsverzeichnis .....	xii
Liste der Aminosäuren .....	xviii
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Leukämie .....	1
1.1.1 Leukämie in Deutschland – Epidemiologie und Ursachen .....	1
1.1.2 Gesunde und leukämische Hämatopoese .....	3
1.1.3 Klassifikation der Leukämien .....	5
1.1.4 Diagnose der akuten myeloischen Leukämie.....	9
1.1.5 Momentane Behandlungsmöglichkeiten der akuten myeloischen Leukämie ...	12
1.2 Die Alzheimer Demenz .....	14
1.2.1 Symptome und Diagnose der Alzheimer Demenz .....	15
1.2.2 Pathogenese der AD.....	17
1.2.3 Gegenwärtige Behandlung der AD.....	21
1.2.4 Krankheitsbeeinflussende Therapieansätze der AD .....	22
1.3 Die Glykogen Synthase Kinase-3 als Target der AML und AD .....	27
1.3.1 Isoformen der GSK-3 .....	28
1.3.2 Struktur der GSK-3 .....	30
1.3.3 Regulierung der GSK-3 .....	32
1.3.4 Die Rolle der GSK-3 im Wnt-Signalweg .....	35
1.3.5 Die GSK-3 in der Tumorregulation.....	37
1.3.6 Die GSK-3 $\alpha$ als therapeutisches Target der akuten myeloischen Leukämie.....	38
1.3.7 Die GSK-3 $\alpha$ als therapeutisches Target der AD.....	39
1.3.8 Entwicklung von GSK-3-Inhibitoren.....	40

1.4	Die Glutaminyl-Cyclase .....	46
1.4.1	Struktur und katalytischer Mechanismus der QC.....	46
1.4.2	Vorkommen und physiologische Funktion der humanen QC .....	48
1.4.3	Die humane Glutaminyl-Cyclase als therapeutisches Target der AD .....	50
1.5	Das Ubiquitin/Proteasom System .....	51
1.5.1	Die Ubiquitinylierung von Proteinen .....	51
1.5.2	Der proteasomale Abbau von Proteinen .....	53
1.5.3	Das Proteasom als therapeutisches Target in der Onkologie.....	56
2	<b>Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>58</b>
3	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>60</b>
3.1	Oxadiazol-Derivate als $\alpha$ -selektive GSK-3-Inhibitoren für eine zielgerichtete Therapie der akuten myeloischen Leukämie .....	60
3.1.1	Einleitung und Motivation.....	62
3.1.2	<i>In silico</i> Design neuer $\alpha$ -selektiver GSK-3-Inhibitoren basierend auf BSc4676..	63
3.1.3	Synthesen der GSK-3-Inhibitoren .....	70
3.1.4	<i>In vitro</i> Aktivität und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der GSK-3-Inhibitoren.	85
3.1.5	Mögliche Ursachen für die $\alpha$ -Selektivität der GSK-3-Inhibitoren.....	90
3.1.6	IC <sub>50</sub> -Werte von BSc5090 (36) gegenüber der GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ im Vergleich zu BSc4676 (33) .....	93
3.1.7	Selektivität von BSc5090 (36) gegenüber anderen Kinasen .....	94
3.1.8	Löslichkeit ausgewählter GSK-3-Inhibitoren .....	95
3.1.9	<i>In vivo</i> Evaluation der GSK-3-Inhibitoren am Zebrafisch-Embryo .....	98
3.1.10	Evaluation der GSK-3-Inhibitoren in AML-Zelllinien.....	102
3.2	Isoform-spezifische GSK-3-Inhibitoren mit löslichkeitsvermittelnden Gruppen	107
3.2.1	<i>In silico</i> Design für das Anbringen von löslichkeitsvermittelnden Gruppen ....	107
3.2.2	Synthese von 61 .....	110
3.2.3	Biologische Aktivität von BSc5184 (61) gegenüber der GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ .	112

3.2.4 Zusammenfassung und Ausblick: Isoform-spezifische GSK-3-Inhibitoren mit löslichkeitsvermittelnden Gruppen.....	113
3.3 Duale Inhibition der GSK-3 und der <i>hQC</i> als neuer Therapieansatz für die AD	114
3.3.1 Entwurf eines potentiell dual-selektiven Inhibitors der GSK-3 und der <i>hQC</i> .	114
3.3.2 Synthese von 73.....	118
3.3.3 Biologische Aktivität von BSc5136 (73) gegenüber der <i>hQC</i> und der GSK-3 $\alpha/\beta$	119
3.3.4 Zusammenfassung und Ausblick: Duale Inhibition der GSK-3 und der <i>hQC</i> ..	120
3.4 Liganden-basierte Leitstrukturentwicklung für neue GSK-3-Inhibitoren.....	121
3.4.1 Liganden-basiertes Design neuer Leitstrukturen für potentielle GSK-3-Inhibitoren	124
3.4.2 Synthesestrategien der potentiellen GSK-3-Inhibitoren.....	131
3.4.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Leitstrukturen 93a/b-95 .....	137
3.4.4 Zusammenfassung und Ausblick: Liganden-basierte Leitstrukturentwicklung	141
3.5 Tivantinib als potentieller $\alpha$ -selektiver GSK-3-Inhibitor.....	144
3.5.1 <i>In vitro</i> Aktivität von Tivantinib gegenüber GSK-3 $\alpha/\beta$ im Vergleich zu c-Met	146
3.5.2 <i>In vivo</i> Evaluation von Tivantinib im Zebrafisch-Embryo .....	148
3.5.3 Zusammenfassung und Ausblick: Tivantinib als GSK-3-Inhibitor .....	150
3.6 Einfluss der Konformation von Met45 auf die enzymatische Aktivität des Proteasoms.....	151
<b>4 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>159</b>
<b>5 Experimenteller Teil .....</b>	<b>164</b>
5.1 Allgemeine Anmerkungen zu den Docking-Methoden.....	164
5.1.1 Vorbereitung der röntgenkristallographischen Proteinstruktur der GSK-3 $\beta$ ...	164
5.1.2 Erzeugung eines Pharmakophormodells basierend auf BSc4676 .....	164
5.1.3 Protein/Liganden-Docking in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$ mit dem auf BSc4676 basierenden Pharmakophormodell .....	165
5.1.4 Erzeugung eines Homologiemodells .....	165
5.1.5 Protein/Liganden-Docking von Tivantinib in das Homologiemodell der GSK-3 $\alpha/\beta$	166

5.1.6	Protein/Liganden-Docking der neuen Leitstrukturen in ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$	166
5.1.7	Protein/Liganden-Docking in das aktive Zentrum der <i>h</i> QC	166
5.2	Allgemeine Anmerkungen zu den chemisch-synthetischen Arbeiten	167
5.2.1	Reagenzien und Lösungsmittel	167
5.2.2	Reaktionsbedingungen	167
5.2.3	Dünnschicht- und Säulenchromatographie	167
5.2.4	HPLC-Untersuchungen	168
5.2.5	NMR-Spektroskopie	168
5.2.6	Massenspektrometrie	169
5.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	169
5.3.1	AAV I: Suzuki Kupplungsreaktion	169
5.3.2	AAV II: Radikalische Bromierung mit NBS	170
5.3.3	AAV III: Bromierung von Benzylalkoholen	170
5.3.4	AAV IV: Nukleophile Substitution zur Darstellung der Thioether	170
5.3.5	AAV V: Nukleophile Substitution zur Darstellung der N-verbrückten Pyrazolpyrimidine	171
5.3.6	AAV VI: Säurekatalysierte nukleophile Substitution zur Darstellung der Anilinpyrimidine	171
5.4	Synthesevorschriften der GSK-3-Inhibitoren und deren Zwischenstufen	171
5.4.1	Bereits bekannte GSK-3-Inhibitoren und deren Zwischenstufen	171
5.4.2	Synthese von BSc5137 (34b)	173
5.4.3	Synthese von BSc5133 (34c)	174
5.4.4	Synthese von BSc5132 (34d)	176
5.4.5	Synthese von BSc5216 (34e)	178
5.4.6	Synthese von BSc5185 (34f)	180
5.4.7	Synthese von BSc5215 (34g)	182
5.4.8	Synthese von BSc5186 (34h)	183
5.4.9	Synthese von BSc5131 (35a)	185
5.4.10	Synthese von BSc5217 (35b)	187



5.4.11 Synthese von BSc5218 (35c) .....	189
5.4.12 Synthese der Tetrazol-Zwischenstufen.....	191
5.4.13 Synthese von BSc5184 (61) .....	194
5.4.14 Synthese von BSc5136 (73) .....	197
5.4.15 Synthese von BSc5224 (93a) .....	200
5.4.16 Synthese von BSc5231 (93b) .....	201
5.4.17 Synthese von BSc5225 (94) .....	202
5.4.18 Synthese von BSc5226 (95) .....	204
5.5 Allgemeine Angaben zur Bestimmung der wässrigen Löslichkeit .....	208
5.5.1 Durchführung der <i>Shake-Flask</i> -Methode .....	208
5.5.2 Erstellen der Kalibriergeraden .....	208
5.5.3 Kalibriergeraden ausgewählter Substanzen zur Bestimmung der wässrigen Löslichkeit	209
5.6 Allgemeine Angaben zu der <i>in vitro</i> Evaluation .....	210
5.6.1 <i>In vitro</i> Assay zur Bestimmung der GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Inhibition.....	210
5.6.2 Z'-LYTE <sup>®</sup> Kinase Assay .....	215
5.6.3 <i>In vitro</i> Assay zur Bestimmung der hQC-Inhibition .....	222
5.6.4 <i>In vitro</i> Assay zur Bestimmung der c-Met Inhibition durch Tivantinib (115).	225
5.7 Allgemeine Angaben zu der <i>in vitro</i> Evaluation in AML-Zelllinien .....	228
5.7.1 Zellkultur.....	228
5.7.2 Western Blot.....	228
5.7.3 Kolonie-Bildungs-Assay.....	229
5.7.4 Morphologische Charakterisierung .....	229
5.7.5 Durchflusszytometrie .....	229
5.8 Allgemeine Angaben zu der <i>in vivo</i> Evaluation im Zebrafisch-Embryo .....	229
5.8.1 Haltung der adulten Zebrafische.....	230
5.8.2 Laich-Prozedur.....	231
5.8.3 E3-Medium zur Arbeit mit Zebrafisch-Embryonen .....	232
5.8.4 Nachzucht.....	232

---

5.8.5 Phänotyp-basiertes Zebrafisch-Embryonen Assay .....	233
Literaturverzeichnis .....	235
Anhang .....	255

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

A	Akzeptor
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
A $\beta$	Amyloid- $\beta$
Ac	Acetyl
AChE	Acetylcholinesterase
AD	<i>Alzheimer's disease</i>
a_heavy	Nicht-Wasserstoffatom
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
AICD	<i>APP intracellular domain</i>
Akt	Proteinkinase B (PKB)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AMC	Aminocoumarin
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	<i>Adenomatös polyposis coli</i>
APL	Akute Promelozytenleukämie
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
ARA-C	Cytosin-Arabinosid
ASXL1	<i>Additional sex combs like 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	<i>Beta-site APP-cleaving enzyme</i>
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
[BMIM]Cl	1-Butyl-3-methyl-imidazolium-chlorid
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Bu	Butyl
C83/C99	83 / 99 Aminosäuren langes, C-terminales Fragment
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK5	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
ChTL	<i>Chymotrypsin-like</i>
CK1	Caseinkinase 1
CL	<i>Caspase-like</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie

CLPs	<i>Common lymphoid progenitors</i>
c-Met	<i>Hepatocyte growth factor receptor (HGFR)</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMs	<i>Common myeloid progenitors</i>
CP	<i>Core particle</i>
CSCs	<i>Cancer stem cells</i>
CSD	<i>Cambridge structur database</i>
Cyp	Cyclopropyl
$\delta$	chemische Verschiebung
D	Donor
d	Duplett (NMR)
3D	3-dimensional
DAD	Diodenarraydetector
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Doppelduplett (NMR)
ddd	Dreifachduplett (NMR)
dddd	Vierfachduplett (NMR)
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
Dis	<i>Disconnection</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Dpf	<i>Days post fertilization</i>
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
DSX	<i>Drug score extended</i>
dt	Doppeltriplett
dtd	Duplett vom Triplet vom Duplett (NMR)
DTT	Dithiothreitol
Dvl	<i>Dishevelled</i>
DYRK1A	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i>
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym

E3	Ubiquitin-Ligase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHT	<i>Extended Hückel theory</i>
EI	<i>Electron ionization</i>
EL	<i>Elastase-like</i>
eq	Äquivalent
ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinase-2</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
Et	Ethyl
FAB	<i>French-American-British</i>
FDP	Freie Demokratische Partei
FGA	<i>Functional group addition</i>
FGI	<i>Functional group interconversion</i>
FGR	<i>Functional group removal</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLT3	<i>Fms-like tyrosin-kinase 3</i>
FRAT	Humane Form des GSK-3 Bindeproteins
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
Fzd	<i>Frizzled-Rezeptor</i>
GEIKD	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
gk	Gatekeeper
GnRH	<i>Gonadotropin releasing hormon</i>
Grg	<i>Groucho-related proteins</i>
GS	Glykogen Synthase
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase 3
HB	Heizblock
HBA	<i>Hydrogen bond acceptor</i>
HBD	<i>Hydrogen bond donator</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HLA	<i>Human leucoyte antigen</i>
hpf	<i>Hours post fertilization</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>

HSCs	<i>Hematopoietic stem cells</i>
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IKK-1	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha</i> (IKK $\alpha$ )
I $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B-Inhibitor
inv	Inversion
ITD	Interne Tandemduplikation
k.A.	Keine Angabe
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> (V-Ki-ras2)
LANCE	<i>Lanthanide chelate excite</i>
LE	Ligandeneffizienz
LH	Luteinisierendes Hormon
LM	Lösungsmittel
logP	<i>n</i> -Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LRP1	<i>Lipo-protein receptor-related protein 1</i>
LRP5/6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
LSCs	<i>Leukemic stem cells</i>
LT-HSCs	<i>Long-term hematopoietic stem cells</i>
m	Multiplett (NMR)
MAP	<i>microtuble associated protein</i>
MARK 1	<i>MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1</i>
MD	Moleküldynamik
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Me	Methyl
MHC	<i>Major Histocompatibility complex</i>
MOE	<i>Molecular Operating Environment</i>
MPO	Myeloperoxidase
MPPs	<i>Multipotent progenitors</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle
NBS	<i>N</i> -Bromsucciminid
n. d.	<i>Not determined</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>

NFTs	<i>Neurofibrillary tangles</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NPM1	<i>Nucleophosmin 1</i>
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>
NSE	<i>Non-specific esterase</i>
NSG	<i>NOD scid gamma</i>
P	Phosphat
p27	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pGLu	Pyroglutamat
Ph	Phenyl
pH	$-\log(a(\text{H}_3\text{O}^+))$
Ph4	Pharmakophor
PHF	Paarige-helikale Filamente
PK	Proteinkinase
PKA	<i>cAMP-dependent protein kinase</i>
ppm	<i>parts per million</i>
Pr	Propyl
QC	Glutaminyl-Cyclase
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
RFU	Relative Fluoreszenz
RMSD	<i>Root-mean-square deviation of atomic position</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RP	<i>Regulatory particle</i>
RT	Raumtemperatur
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
s	Singulett (NMR)
sAPP $\alpha/\beta$	Durch die $\alpha/\beta$ -Sekretase abgespaltene, N-terminale Domäne des APPs

SEM	<i>Standard error of the mean</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
SNAAP	<i>Small neutral amino acid preferring</i>
SPECT	<i>Single-photon emission computed tomography</i>
ST-HSCs	<i>Short-term hematopoietic stem cells</i>
T	Temperatur
t	Triplett (NMR)
t	Translokation
TBACl	Tetrabutylammoniumchlorid
TCF/Lef	<i>T-cell factor/lymphoid enhancer factor</i>
td	Triplett vom Duplett (NMR)
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr1O $\gamma$	$\gamma$ -Sauerstoffatom der Threonin1-Seitenkette
Thr1N	N-terminales Amin von Threonin1
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TL	<i>Trypsin-like</i>
TLE	<i>Transductin-Like Enhancer of Split</i>
TPSA	<i>Topological polar surface area</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRH	<i>Thyreotropin releasing hormon</i>
Trt	Trityl
Ts	Tosyl
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin/Proteasom-System
VE	Voll-entsalzen
VWD	<i>Variable wavelenght detector</i>
WHO	<i>World-Health-Organization</i>
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem



---

## Liste der Aminosäuren

---

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

---

## 1 Einleitung

---

### 1.1 Leukämie

Bereits seit *Hippokrates* war das Krankheitsbild der Leukämie mit den typischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Blässe, Fieber, vermehrtes Schwitzen, Nasen- sowie Zahnfleischbluten, Vergrößerung der peripheren Lymphknoten und der Milz bekannt. Aber erst durch die Einführung der Mikroskopie konnten Einblicke in biologische Vorgänge auf zellulärer Ebene gewonnen werden. Daraus resultierten revolutionäre Entdeckungen auf dem Gebiet der Hämatologie. Diese führten zwischen 1839 – 1845 schließlich zur Erkennung der Leukämie als eigenem Krankheitsbild.<sup>[1]</sup> Der Begriff Leukämie (altgr. *Leukós* = weiß und *haima* = das Blut) wurde erstmals 1847 von dem deutschen Arzt *Rudolf Virchow* verwendet.<sup>[2]</sup> Dieser hatte zuvor bei einer Patientin beobachtet, dass ihr Blut nur aus sehr wenigen roten Blutkörperchen, aber aus zahlreichen farblosen und weißen Blutzellen bestand. Virchows Bezeichnung der „Weißblütigkeit“ fand seither Eingang in die Medizin.<sup>[1-2]</sup> Die Leukämien umfassen verschiedene Krebserkrankungen des blutbildenden Systems, die sich bezüglich Häufigkeit, Ursachen, Therapiemöglichkeiten und Heilungsprognosen stark voneinander unterscheiden.<sup>[3]</sup>

#### 1.1.1 Leukämie in Deutschland – Epidemiologie und Ursachen

Mit seinem Buch „Zwischen zwei Leben. Von Liebe, Tod und Zuversicht.“ sowie mehreren Interviews rückte *Guido Westerwelle*, ehemaliger Außenminister und langjähriger FDP-Chef, Ende 2015 die Leukämie in den Fokus der öffentlichen Aufmerksamkeit. Nach langem Kampf erlag Guido Westerwelle jedoch am 18. März 2016 den Folgen seiner Krankheit.<sup>[4]</sup> *Guido Westerwelle* ist einer von jährlich etwa 13 000 Menschen in Deutschland, die an einer Leukämie erkranken.<sup>[5]</sup>

Mit 2.8% aller Tumorerkrankungen bei Männern und 2.4% bei Frauen sind die Leukämien im Vergleich zu anderen Krebsarten, wie z.B. Brust- (30.8%), Prostata- (25.3%) und Darmkrebs (13.4% Männer und 12.6% Frauen), in Deutschland relativ selten (Abbildung 1).<sup>[5]</sup>

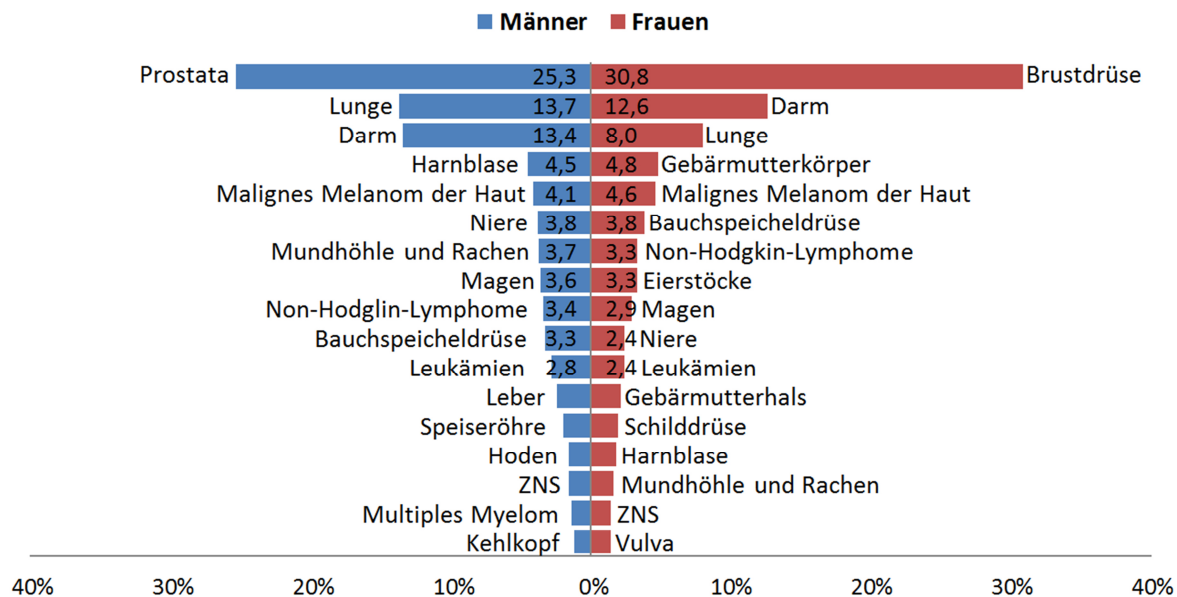


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen 2012 in Deutschland. In Anlehnung an die *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland* (GEKID).<sup>[5]</sup>

Im Jahr 2012 erkrankten in Deutschland Männer mit 7 180 Neuerkrankungen etwas häufiger an Leukämien als Frauen (5 460). Darunter waren etwa 700 Patienten unter 15 Jahren alt. Leukämien sind mit 33,4% die häufigste Krebserkrankung bei unter 15-Jährigen. Unabhängig vom Geschlecht sinkt bei Kindern die Wahrscheinlichkeit an Leukämien zu erkranken mit zunehmendem Alter (Abbildung 2). Ab dem 30. Lebensjahr steigt jedoch das Krankheitsrisiko mit dem Alter wieder an, wobei die Inzidenz für Männer höher ist als für Frauen. Mit einem medianen Erkrankungsalter von 71 Jahren für Männer und von 73 Jahren für Frauen sind die Leukämien Erkrankungen des höheren Alters. Dennoch können die einzelnen Leukämieformen in jedem Alter auftreten und zeigen unterschiedliche Altersgruppenverteilungen.<sup>[5]</sup>

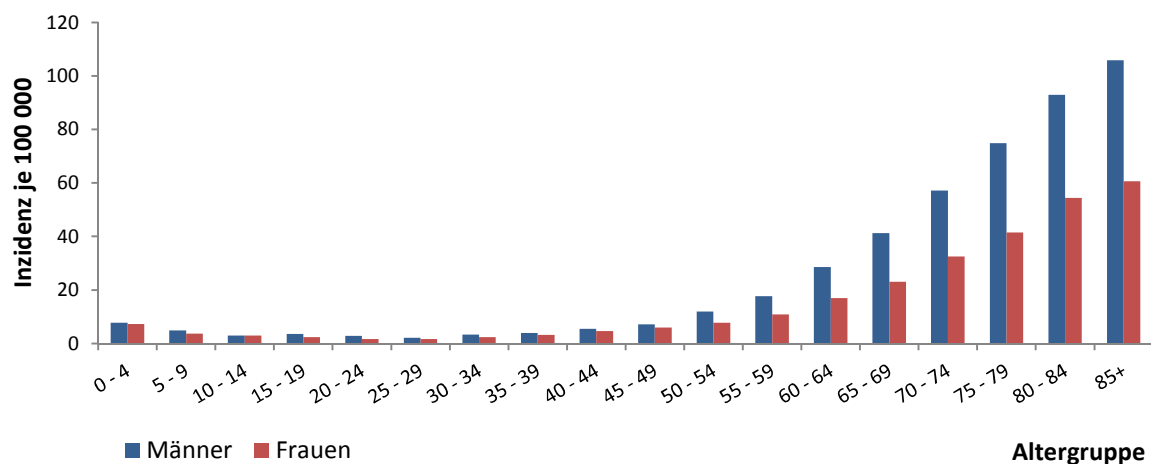


Abbildung 2: Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht, Deutschland 2011 – 2012. In Anlehnung an GEKID.<sup>[5]</sup>

Die Ursachen von Leukämien sind weitgehend ungeklärt. Zu den erwiesenen Risikofaktoren von Leukämien gehören vor allem genverändernde Faktoren, wie ionisierende Strahlen, z.B. bei einer Strahlentherapie, Zytostatika aufgrund einer vorhergehenden Chemotherapie einer anderen Krebserkrankung oder Kontakt mit verschiedenen Chemikalien wie Benzol.<sup>[5-6]</sup> Als häufigste Quelle für den Kontakt mit Benzol wird insbesondere Zigarettenrauch angenommen. Dementsprechend besitzen Raucher ein erhöhtes Risiko an Leukämie sowie an anderen Krebsarten zu erkranken.<sup>[6]</sup> Dennoch wird in der Vorgeschichte der meisten Patienten keiner dieser Risikofaktoren gefunden. Vermutlich spielen neben den umweltbedingten auch angeborene genetische Veränderungen, wie eine Trisomie des Chromosoms 21, eine wichtige Rolle für das Erkrankungsrisiko, ohne jedoch dabei selbst der Auslöser zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass für die Entstehung einer Leukämie mehrere Faktoren zusammenkommen müssen.<sup>[5-6]</sup>

### **1.1.2 Gesunde und leukämische Hämatopoese**

Der menschliche Körper besteht aus etwa 100 Billionen einzelner Zellen. Nahezu jede Körperzelle wird kontinuierlich erneuert, indem sie einen geordneten Kreislauf aus Wachsen, Sterben und Neubildung durchläuft. Rhythmus und Mechanismus der Zellregeneration unterscheiden sich je nach Körperzelle stark. Blutzellen haben nur eine begrenzte Lebensdauer von wenigen Tagen. Um die Anzahl an Blutzellen aufrechtzuerhalten entstehen bei der sogenannten Hämatopoese täglich Milliarden an reifen Blutzellen. Somit ist unser Blut eines der am stärksten regenerativen Organe.<sup>[7]</sup> Für die Hämatopoese ist innerhalb des Knochenmarks ein sehr kleiner Teil an Knochenmarkzellen (0.01-0.20%), die sogenannten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs), verantwortlich.<sup>[8-9]</sup> Die HSCs halten dabei das System stets in Balance, um zum einen eine lebenslange Hämatopoese zu gewährleisten und zum anderen das Blutsystem effektiv zu regenerieren. Um diese Balance aufrecht zu halten, befinden sich die HSCs stets in einem stark kontrollierten Konflikt zwischen Selbsterneuerung oder Differenzierung, diversen Differenzierungsrichtungen, Proliferation oder Quieszenz, Mobilität oder Stillstand, Überleben oder Apoptose.<sup>[7, 9-10]</sup>

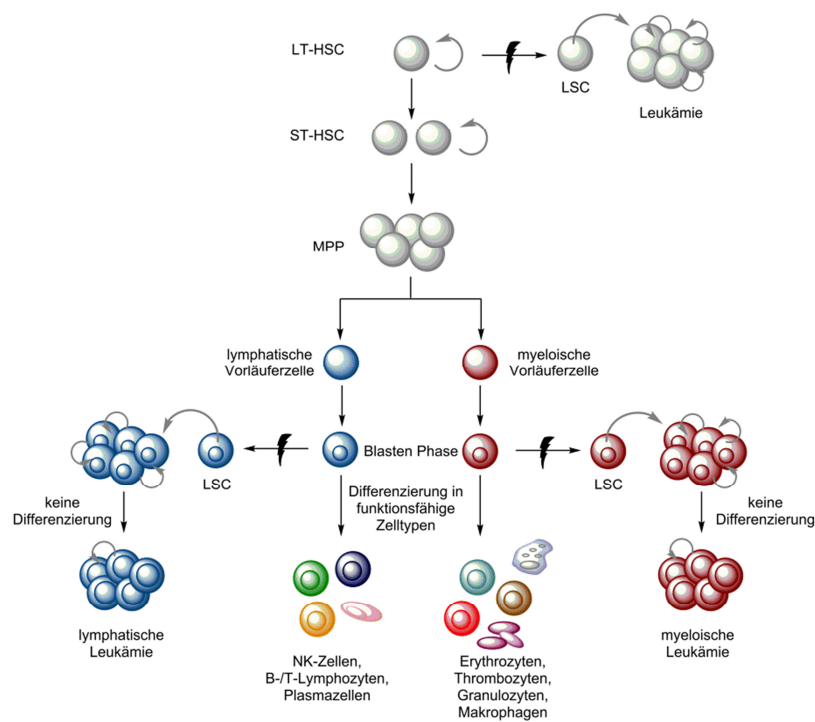


Abbildung 3: Vereinfachtes Modell der gesunden und leukämischen Hämatopoese. Ausgehend von multipotenten Stammzellen (LT-HSCs) kommt es zur schrittweisen Differenzierung in die verschiedenen funktionsfähigen Blutzellen. Leukämische Stammzellen (LSCs), hervorgerufen durch Mutationen (Blitz) innerhalb verschiedener Entwicklungsstufen, sind der Ursprung für die Entstehung von Leukämien. In Anlehnung an *Riether et al.*<sup>[8]</sup>

Die Reifung der Blutzellen, ausgehend von den HSCs, folgt einem stark hierarchischen System (Abbildung 3). An dessen Spitze befinden sich die Langzeit-Stammzellen (*long-term hematopoietic stem cells*, LT-HSCs). Diese besitzen die Fähigkeit der dauerhaften Selbsterneuerung, um so das Blutsystem lebenslang zu rekonstruieren.<sup>[7, 9-10]</sup> Die LT-HSCs teilen sich sehr langsam. Währenddessen verlieren sie ihre Fähigkeit der lebenslangen Selbsterneuerung. Aus diesem Grund werden die nachfolgenden Zellen als Kurzzeit-Stammzellen (*short-term hematopoietic stem cells*, ST-HSC) bezeichnet. Die ST-HSCs können sich nur noch für einen begrenzten Zeitraum von ungefähr 8 Wochen selbsterneuern.<sup>[9, 11]</sup> Die ST-HSCs differenzieren weiter zu den multipotenten Vorläuferzellen (*multipotent progenitors*, MPPs). Die MPPs haben die Fähigkeit der Selbsterneuerung komplett verloren, im Gegensatz dazu steigt ihre Proliferationsrate stark an.<sup>[7, 10]</sup> Die MPPs differenzieren weiter zu den oligopotenten Vorläuferzellen des lymphatischen (*common lymphoid progenitors*, CLPs) sowie des myeloischen (*common myeloid progenitors*, CMPs) Systems. Über irreversible Reifungsstufen differenzieren die CLPs und CMPs letztendlich über unreife Blasten zu den funktionsfähigen Zelltypen des Blutsystems.<sup>[9-10, 12]</sup> Aus den CLPs entstehen natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Plasmazellen sowie B- und T-Lymphozyten.<sup>[9-10, 12-]</sup>

<sup>13]</sup> Während aus den CMPs Erythrozyten, Thrombozyten, verschiedene Arten an Granulozyten und Makrophagen hervorgehen. Am Ende treten die ausgereiften, funktionsfähigen Zellen aus dem Knochenmark in das zirkulierende Blut über.<sup>[9-10, 12, 14]</sup>

Bei der Entstehung von Leukämien wird von der sogenannten Krebsstammzellen-Theorie (*cancer stem cells*, CSCs) ausgegangen. Dabei sind einige wenige Zellen, welche Stammzellen-Eigenschaften besitzen, für die Ausbreitung der Krankheit verantwortlich. Bei der Leukämie werden diese krebs-initiierenden Zellen als leukämische Stammzellen (*leukemic stem cells*, LSCs) bezeichnet.<sup>[8, 15-16]</sup>

Für die meisten Leukämien sind die Ursprungszellen in denen die Mutationen zur LSCs stattfinden unbekannt. HSCs sowie LSCs haben die Fähigkeit der Selbsterneuerung gemeinsam. Die lange Lebenszeit der HSCs erhöht nicht nur die Wahrscheinlichkeit für auftretende bösartige Mutationen, sondern ermöglicht auch deren Akkumulation. Folglich wird davon ausgegangen, dass HSCs der Ursprung für LSCs sein können.<sup>[8-9, 16]</sup>

Des Weiteren können aus Zellen in höheren Entwicklungsstufen, wie der Blasten-Phase, die LSCs hervorgehen. Um LSCs zu erzeugen, müssen hierbei die Leukämie-initiierenden Zellen zuvor die Fähigkeit der Selbsterneuerung sowie der unkontrollierten Proliferation wiedererlangt haben.<sup>[8-9, 17]</sup>

Unabhängig der Herkunft produzieren beide Arten an LSCs weiterdifferenzierte Blasten, welche ein hohes Proliferationspotential, eine fehlende terminale Differenzierung und eine gestörte Apoptose aufweisen. Dies führt zur Akkumulation der unreifen, entarteten Blasten im Knochenmark und letztlich zum klinischen Krankheitsbild der unterschiedlichen Leukämieformen.<sup>[8]</sup>

### **1.1.3 Klassifikation der Leukämien**

Basierend auf den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (*World-Health-Organization*; WHO) erfolgt die Unterteilung der verschiedenen Leukämieformen entsprechend der morphologischen und immunologischen Eigenschaften der Immunzellen. Dabei wird je nach beteiligter Zelllinie zwischen den myeloischen und den lymphatischen Leukämien unterschieden (Abbildung 3).<sup>[8]</sup> Die myeloischen Leukämien umfassen alle Zellen, welche zu den granulozytären (neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten), monozytären, erythrozytären und

megakaryozytären Zelllinien gehören.<sup>[12, 18]</sup> Während zu den lymphatischen Leukämien alle Zellen der Plasmazellen, der NK-Zellen sowie der B-Zell- und der T-Zell-Gruppe gehören.<sup>[8, 12]</sup>

Je nach Krankheitsverlauf werden beide Leukämieformen weiter in akute und chronische Formen eingestuft. Die akuten Leukämien sind durch einen schnellen und lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Ohne Behandlung können diese innerhalb weniger Wochen bis Monaten zum Tod führen. Die chronischen Leukämien hingegen sind anfangs meist symptomarm und können sich so unbemerkt über mehrere Jahre entwickeln.<sup>[3]</sup>

Entsprechend dieser Klassifizierung werden die Leukämien in die akute myeloische Leukämie (AML), die chronische myeloische Leukämie (CML), die akute lymphatische Leukämie (ALL) und die chronische lymphatische Leukämie (CLL) unterteilt. Mit 20% ist die AML, nach der CLL (40%), die zweithäufigste Leukämieform in Deutschland (Abbildung 4).<sup>[5]</sup>

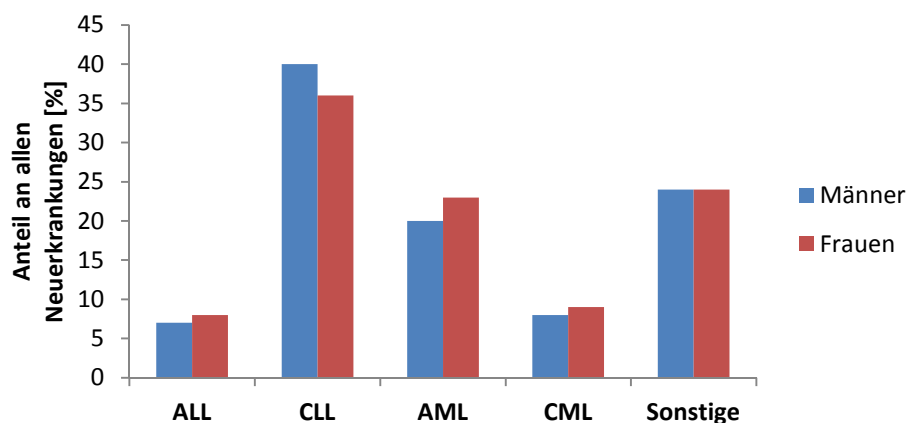


Abbildung 4: Anteile der verschiedenen Leukämieformen an allen Neuerkrankungen in Deutschland in den Jahren 2011-2012. In Anlehnung an GEKID.<sup>[5]</sup>

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird in erster Linie das Augenmerk auf die AML gelegt, auf welche im weiteren Verlauf im Detail eingegangen wird.

Die AML ist ein sehr heterogenes Krankheitsbild. Für eine genaue Diagnose und Auswahl der geeigneten Behandlung wird die Erkrankung zusätzlich nach morphologischen, genetischen und klinischen Kriterien in verschiedene prognostische Subtypen klassifiziert. Im klinischen Alltag werden dabei die ältere FAB-Klassifikation (*French-American-British*; FAB) von 1976 sowie die neue WHO-Klassifikation von

2008 parallel verwendet. Die FAB-Klassifikation unterteilt die AML nur anhand morphologischer und zytochemischer Merkmale der Blasten in 8 Subgruppen M0-M7 (Tabelle 1).<sup>[19-21]</sup>

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML.<sup>[19-21]</sup>

FAB-Subtyp	Beschreibung	Morphologie
<b>M0</b>	AML mit minimaler Differenzierung	Myeloblasten ohne Granula
<b>M1</b>	AML ohne Ausreifung	Myeloblasten +/- Granula
<b>M2</b>	AML mit Ausreifung	Myeloblasten mit Granula, einzelne Myelozyten
<b>M3</b>	Akute Promyelozytenleukämie (APL)	Promyelozyten, deutlich granuliert
<b>M4</b>	Akute myelomonozytäre Leukämie	Myeloblasten und Promeyelozyten >20%
<b>M5a</b>	Akute Monozytenleukämie ohne Ausreifung	Große Monoblasten
<b>M5b</b>	Akute Monozytenleukämie mit Ausreifung	Monoblasten, Promozyten und Monozyten, Monozytose im peripheren Blut
<b>M6</b>	Akute Erythroleukämie	Megaloblastäre Erythropoese >50% Myeloblasten >30%
<b>M7</b>	Akute Megakaryoblastenleukämie	Megakaryoblasten

Während bei der FAB-Klassifikation zytogenetische Aberrationen nicht berücksichtigt werden, verbindet die neue WHO-Klassifikation (2008) hingegen die ältere FAB-Klassifikation mit den neuen genetischen Erkenntnissen, da diese für die Diagnose, die Therapie sowie die Prognose richtungsweisend sind. Folglich wird heutzutage überwiegend die WHO-Klassifikation (2008) verwendet, welche die AML nach morphologischen, immunophänotypischen, zyto- und molekulargenetischen sowie klinischen Merkmalen in 4 verschiedene Hauptgruppen mit weiteren Untergruppen unterteilt (Tabelle 2).<sup>[18, 21-23]</sup>



Tabelle 2: WHO-Klassifikation (2008) der AML.<sup>[18]</sup>

<b>AML mit wiederkehrenden genetischen Veränderungen</b>	AML mit t(8;21)(q22;q22), RUNX1-RUNX1T1
	AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22), (CBFB/MYH11)
	APL mit t(15;17)(q22;q12), PML/RARA
	AML mit t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
	AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
	AML mit inv(3)(q21Q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
	Provisorische Entität: AML mit NPM1-Mutation Provisorische Entität: AML mit CEBPA-Mutation
<b>AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen</b>	Mit vorangegangenem myelodysplastischem Syndrom
	Ohne vorangegangenes myelodysplastisches Syndrom, aber mit Dyplasien in mindestens 50% der Zellen in 2 oder mehr Linien der Hämatopoese
<b>Therapieassoziierte myeloische Neoplasien</b>	Nach Chemotherapie mit alkylierenden Substanzen
	Nach Chemotherapie mit Epipodophyllotoxinen (Topoisomerase-II-Inhibitoren)
	Andere Auslöser
<b>Nicht anderweitig klassifizierbare AML</b>	AML mit minimaler Differenzierung
	AML ohne Ausreifung
	AML mit Ausreifung
	Akute myelomonozytäre Leukämie
	Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie
	Akute Erythroleukämie
	Akute Megakaryoblastenleukämie
	Akute Basophilenleukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Zugleich charakterisiert die WHO die AML durch einen Blastenanteil im Knochenmark von 20% oder mehr. Somit kann eine Abgrenzung der AML vom myelodysplastischen Syndrom eindeutig erfolgen.<sup>[18, 21]</sup>

### 1.1.4 Diagnose der akuten myeloischen Leukämie

Einige der AML Symptome, wie Müdigkeit oder Hautblässe, sind unspezifisch und treten auch bei anderen Erkrankungen auf. Andere Symptome hingegen, wie die Vergrößerung der Milz, Leber und Lymphknoten sowie Fieber und erhöhte Infektneigung, weisen vielmehr auf eine akute Leukämie hin. Die Symptome der AML entstehen vor allem durch die Ausbreitung der leukämischen Zellen im Knochenmark und im Blut, wodurch die normale Hämatopoese verdrängt wird und ein Mangel an funktionstüchtigen Blutzellen entsteht.<sup>[24]</sup>

Besteht ein Verdacht auf eine akute Leukämie wird zunächst das Blut untersucht. Dabei wird ein Differentialblutbild erstellt, bei dem die Anzahl der unterschiedlichen Blutzellen gezählt wird. Des Weiteren wird untersucht, ob sich im Blut des Patienten auffällige Zellen wie Blasten befinden. Wird der Verdacht durch beispielsweise Anämie, Thrombozytenmangel, Vermehrung oder Verminderung der Leukozyten oder durch die Anwesenheit von Blasten bestätigt, wird eine Knochenmarkpunktion durchgeführt.<sup>[24]</sup> Die dabei entnommenen Zellen werden anschließend mittels Zytomorphologie, Zytochemie, Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik analysiert (Abbildung 5).<sup>[23-25]</sup>

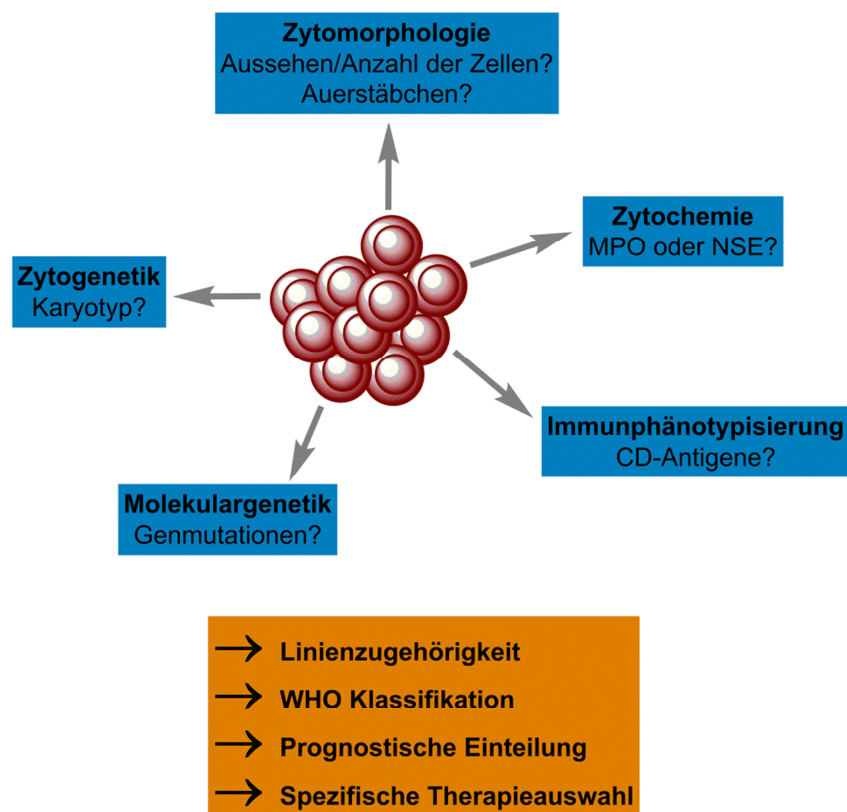


Abbildung 5: Diagnostisches Spektrum bei der AML Charakterisierung von Leukämiezellen (NSE = *Non-specific Esterase*, MPO = Myeloperoxidase, CD = *Cluster of Differentiation*). In Anlehnung an Schaich und Ehninger.<sup>[23]</sup>

---

Die endgültige Diagnose einer akuten Leukämie wird durch die Zytomorphologie gestellt. Dabei werden die Knochenmarkzellen nach Aussehen und Anzahl beurteilt.<sup>[24-25]</sup> Durch das Auffinden von rötlich-violetten Einschlüssen in den Zellen, den sogenannten Auer-Stäbchen, kann in manchen Fällen bereits die Linienzugehörigkeit ermittelt werden.<sup>[25]</sup>

Die Bestimmung der Linienzugehörigkeit erfolgt ansonsten vorwiegend mittels der zytochemischen Untersuchung. So können durch die Expression von Myeloperoxidasen (MPO) myeloische Zellen und durch die Expression von unspezifischen Esterasen (*non-specific esterase*, NSE) monozytäre Zellen nachgewiesen werden.<sup>[23, 25]</sup>

Bei der Immunphänotypisierung werden mithilfe von monoklonalen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern die Oberflächenmarker der Leukämiezellen markiert. Das Expressionsmuster der Oberflächenmarker, auch CD-Antigene (*Cluster of Differentiation*, CD) genannt, ist jeweils spezifisch für den Zelltyp sowie den Differenzierungsgrad einer Zelle. Mittels der Immunphänotypisierung lassen sich somit die leukämischen Zellen den verschiedenen Zelllinien und Reifungsstadien zuordnen.<sup>[25-26]</sup>

Eine zytogenetische Untersuchung ist bei jedem Patienten unerlässlich. Bei den meisten der erwachsenen AML Patienten lassen sich dabei zytogenetische Aberrationen detektieren. Der erhaltene Karyotyp ist essentiell für die Therapieentscheidung, da er prognostische Informationen in Bezug auf das Ansprechen der Therapie oder das Überleben, liefert.<sup>[23, 25, 27]</sup> Nach den Kriterien des *Medical Research Councils* werden die verschiedenen wiederkehrenden zytogenetischen Veränderungen in 3 Risikogruppen kategorisiert (Tabelle 3). Die Einteilung erfolgt in prognostisch günstigem, intermediärem und ungünstigem Karyotyp.<sup>[25, 28]</sup>

Tabelle 3: Einteilung der AML nach den Kriterien des *Medical Research Councils*.<sup>[25, 28]</sup>

Prognostische Einteilung	Chromosomenaberration
<b>Günstiger Karyotyp</b>	t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)
<b>Intermediärer Karyotyp</b>	Alle Karyotypen , die weder eine günstige noch eine ungünstige prognostische Bedeutung haben
<b>Ungünstiger Karyotyp</b>	Anomalien des Chromosoms 3q inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) Anomalien der Chromosomen 5 oder 5q Anomalien der Chromosomen 7 oder 7q t(6;11)(q27;q23) t(10;11)(p11~13;q23) t(11q23) [Ausnahmen: t(9;11)(p21~22;q23); t(11;19)(q23;P13)] t(9;22)(q34;q11) -17; 17p-Anomalien Komplexe Veränderungen ( 4 klonale Anomalien)

Mittels der PCR-Untersuchung (*polymerase chain reaction*, PCR) können spezifische molekulare Mutationen, sowohl bei der Erstdiagnose als auch während der Therapie, identifiziert werden.<sup>[25]</sup> Nahezu 50%<sup>[29]</sup> der AML-Patienten besitzen einen intermediären Karyotyp, denen aus zytogenetischer Sicht weder eine günstige noch eine ungünstige Prognose gegeben werden kann. Vor allem für diese Patienten spielen molekulare Mutationen bei der Risikoabschätzung und Therapieauswahl eine entscheidende Rolle. Für die häufigsten Mutationen, wie innerhalb der Gene der FLT3, NPM1, CEBPA, RUNX1 und ASXL1, ist die Wahrscheinlichkeit auf Therapieerfolge oder Resistenz gegenüber der Standardchemotherapie relativ gut vorhersagbar (Tabelle 4). Somit kann anhand der bekannten Mutationen auch für diese heterogene Patientengruppe eine sinnvolle prognostische Zuordnung erfolgen.<sup>[25, 29-31]</sup>

Tabelle 4: Häufigste Genmutationen bei Patienten mit intermediären Karyotyp.<sup>[30]</sup>

Mutation	Häufigkeit [%]	Prognose
FLT3-ITD	20	Ungünstig; Resistenzen gegenüber der Standardchemotherapie bekannt
FLT3-TKD	11-14	Kontroverse prognostische Bedeutung
NPM1	30	Günstig; hoher Anteil an kompletter Remission nach Standardchemotherapie
CEBPA	10-15	Günstig
IDH1/2	15-33	Kontroverse prognostische Bedeutung
TET2	7	Keine genauen Daten
DNMT3A	20-22	Kontroverse Daten
ASXL1	6-30	Ungünstig

### 1.1.5 Momentane Behandlungsmöglichkeiten der akuten myeloischen Leukämie

Als Standardtherapie der AML wird nach wie vor eine intensive Chemotherapie mit verschiedenen Zytostatika (gr. *cyto* = Zelle und *statik* = anhalten) durchgeführt. Die hochtoxischen Zytostatika stören die Teilung der Zellen und schädigen somit vor allem schnell teilende Zellen. Leukämische Zellen sind gegenüber Zytostatika empfindlicher als gesunde Zellen, da diese eine erhöhte Zellteilungsrate sowie defekte Reparaturmechanismen besitzen. Somit können die Leukämiezellen mittels Zytostatika vernichtet oder enorm dezimiert werden.<sup>[24]</sup>

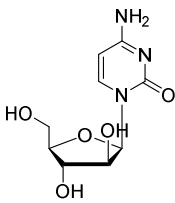
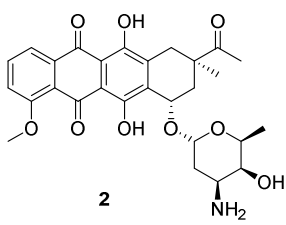
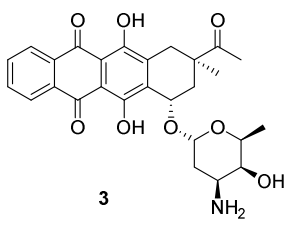
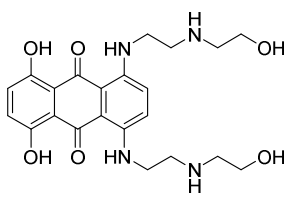
Die Chemotherapie der AML gliedert sich in zwei Phasen, welche sich in Dauer, eingesetzten Medikamenten und deren Dosis unterscheiden. Klinische Faktoren wie das Alter, der gesundheitliche Allgemeinzustand oder der Erkrankungsstatus spielen bei der Wahl der geeigneten Therapie genauso eine wichtige Rolle wie der Karyotyp oder vorliegende Genmutationen.<sup>[23-24, 32]</sup>

Bei allen Patienten erfolgt als erste Behandlungsphase die sogenannte Induktionstherapie. Das Ziel der Induktionstherapie ist es, innerhalb kurzer Zeit die kranken Zellen soweit zu zerstören, dass eine komplette Remission erreicht wird. Diese zeichnet sich durch einen prozentualen Anteil von weniger als 5% leukämischen Zellen im Knochenmark und einer gesunden, normalisierten Blutbildung aus.<sup>[23-24]</sup> In der Induktionsphase wird eine hoch dosierte Chemotherapie aus einer

Medikamentenkombination angewendet. Standardisiert wird die 3+7 Kombinationstherapie aus dem Anthrazyklin **Daunorubicin (2)** (für 3 Tage) und dem Nukleosid-Analoga **Cytarabin (1, ARA-C)** (für 7 Tage) gegeben. Alternativ zu **Daunorubicin** wird auch das Anthrazyklin **Idarubicin (3)** oder das Anthracendion **Mitoxantron (4)** eingesetzt (Tabelle 5).<sup>[6, 24]</sup>

Die anschließende zweite Phase, die sogenannte Konsolidationstherapie, soll die wenigen noch vorhandenen leukämischen Zellen zerstören, um die Remission zu erhalten und so ein Rezidiv der Krankheit zu vermeiden. In dieser Intensivphase werden risikoadaptiert höhere Medikamentendosierungen und andere Medikamentenkombinationen verwendet.<sup>[6, 23-24]</sup>

Tabelle 5: Wichtige Zytostatika für die Behandlung der AML.

Wirkstoff	Struktur	Wirkweise
Cytarabin (ARA-C)	 <p>1</p>	Cytosin-Analoga
Daunorubicin	 <p>2</p>	DNA-Interkalator Topoisomerase II Inhibitor
Idarubicin	 <p>3</p>	DNA-Interkalator Topoisomerase II Inhibitor
Mitoxantron	 <p>4</p>	DNA-Interkalator Topoisomerase II Inhibitor

Die eingesetzten Medikamente greifen die Zellteilung auf unterschiedliche Weise an. Das Cytosin-Analoga **ARA-C (1)** wird als falscher Nukleosid-Baustein während der

---

DNA-Replikation in die DNA eingebaut und blockiert so die DNA-Reparaturmechanismen. **Daunorubicin (2)**, **Idarubicin (3)** und **Mitoxantron (4)** wirken als DNA-Interkalatoren. Durch ihre planare Struktur lagern sie sich in die Doppelhelix der DNA und behindern so die Transkription der DNA zur Bildung von RNA. Zusätzlich inhibieren sie die Topoisomerase II, welche für die DNA-Reparatur zuständig ist. Sämtliche Zytostatika blockieren die Zellteilung und führen letztlich zur Apoptose der Zellen.

Bei der Chemotherapie ist es unvermeidlich, dass auch die Zellteilung gesunder Zellen gestört wird. Vor allem sich schnell teilende Körperzellen, wie die der Haarwurzeln oder der Schleimhaut des Mundes und des Magen-Darm-Traktes. Dies führt zu sehr starken Nebenwirkungen wie Haarausfall, Übelkeit und Erbrechen.<sup>[24]</sup>

Bei AML-Formen mit hohem Rückfallrisiko und wenig Aussicht auf Konsolidierung durch die Chemotherapie wird häufig zusätzlich eine Stammzellentransplantation durchgeführt. Das höchste antileukämische Potenzial hat eine allogene Stammzellentransplantation von HLA-kompatiblen (*human leucocyte antigen*, HLA) Familienspendern und sollte so früh wie möglich erfolgen.<sup>[23-24]</sup>

Die Heilungsprognose hängt von der Krankheitsform, dem Diagnosealter und dem gesundheitlichen Allgemeinzustand ab. Die Heilungsrate bei Patienten unter dem 60. Lebensjahr liegt bei 40-45%. Bei Patienten über dem 60. Lebensjahr ist eine dauerhafte Heilung nur selten möglich. Es gibt nur wenige Langzeitüberlebende.<sup>[33-34]</sup>

## 1.2 Die Alzheimer Demenz

26. November 1901: „Wie heißen Sie?“ – „Auguste.“ – „Familiennamen?“ – „Auguste.“ – „Wie heißt ihr Mann?“ – „Ich glaube Auguste.“<sup>[35-36]</sup> Mit diesem bedrückenden Dialog beginnt die Krankenakte der *Auguste Deter*, in der zum ersten Mal die Alzheimer Demenz (*Alzheimer's disease*, AD) beschrieben wird. Die 50-jährige Patientin wurde 1901 von ihrem Mann aufgrund von zunehmender Gedächtnisschwäche in die „Städtische Irrenanstalt Frankfurt am Main“ eingeliefert. Der Fall der *Auguste Deter* weckte größte Aufmerksamkeit bei ihrem zu behandelnden Arzt, dem Psychiater und Neuropathologen *Dr. Alois Alzheimer*. In ihrer Krankenakte beschreibt *Alzheimer* die viereinhalb Jahre zwischen Einlieferung und ihrem Tod, welche von einem starken geistigen Verfall begleitet waren. Nach ihrem Tod 1906 untersuchte *Alzheimer* ihr Gehirn und fand in der gesamten Hirnrinde Eiweißablagerungen und viele

---

abgestorbene Nervenzellen.<sup>[35-36]</sup> 1907 veröffentlichte *Alzheimer* in seiner Arbeit „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ den Fall der *Auguste Deter*.<sup>[37]</sup> Seine erstmalige Erläuterung des klinischen Bildes der AD fand damals jedoch noch keine wissenschaftliche Anerkennung. Erst später führte *Emil Kraepelin* in seinem angesehenem Lehrbuch der Psychiatrie den Begriff der „Alzheimerschen Krankheit“ ein.<sup>[36, 38]</sup>

Deutschlandweit leiden etwa 1.6 Millionen Menschen an einer Demenz, die Mehrheit davon an der AD (schätzungsweise 1.2 Millionen).<sup>[39-40]</sup> Weltweit sind knapp 47 Millionen Menschen betroffen. Alle 3.2 s erkrankt ein Mensch an einer Demenz. Folglich wird für das Jahr 2050 eine Verdreifachung auf 131.5 Millionen erkrankter Menschen prognostiziert.<sup>[39]</sup> Die Zahl der Erkrankungen wird auch aufgrund der Zunahme des Anteils älterer Menschen in der Bevölkerung steigen, da die Wahrscheinlichkeit zu erkranken mit zunehmendem Alter steigt.<sup>[41-43]</sup>

2015 lagen die weltweiten Krankheitskosten bei 818 Milliarden US-Dollar und im Jahr 2018 könnten es bereits eine Billion US-Dollar sein.<sup>[39]</sup> Der massive Anstieg der Patienten und die Zunahme der Kosten für Behandlung und Pflege stellen folglich eine soziale und ökonomische Belastung dar. Als schwerwiegendes Gesundheitsproblem der Zukunft stellt die AD die weltweiten Gesundheits- und Sozialsysteme vor enorme Herausforderungen.<sup>[39, 44]</sup>

### **1.2.1 Symptome und Diagnose der Alzheimer Demenz**

Der Begriff der Demenz (lat. *demens* = wahnsinnig, verrückt) umfasst verschiedene Erkrankungen, die mit dem Verlust der geistigen Funktionen wie Erinnern, Denken, Orientierung und Verknüpfung von Denkeinheiten einhergehen. Die AD ist mit 60-80% die häufigste Form der Demenzerkrankungen.<sup>[45-46]</sup>

Schwierigkeiten sich an jüngste Konversationen, Ereignisse oder neue Namen zu erinnern sind die ersten klinischen Symptome.<sup>[45]</sup> Mit fortschreitender Krankheit verstärkt sich der Gedächtnisverlust mehr und mehr, sodass die Patienten nicht einmal mehr die Antwort auf die einfache Frage von *Alois Alzheimer* „Wie heißen Sie?“ wissen.<sup>[36]</sup> Außerdem treten Sprachprobleme, Verwirrtheit, zeitliche und örtliche Desorientierung, Stimmungs- und Verhaltensänderungen, einschließlich Depressionen und Apathie, auf. Es kommt zu einem vollständigen Verlust von Selbständigkeit und Alltagskompetenzen, sodass die Patienten bei einfachen Tätigkeiten, wie der täglichen



Körperpflege oder dem Essen, auf Hilfe angewiesen sind. Im Endstadium der Krankheit werden die Patienten bettlägerig und benötigen rund um die Uhr eine intensive Betreuung. Die AD führt, bedingt durch die Bettlägerigkeit und der dadurch entstehenden erhöhten Infektanfälligkeit, letztendlich zum Tod.<sup>[43, 45]</sup>

Die Diagnose der AD ist nicht leicht zu stellen, da es keine AD-spezifischen Symptome gibt. Viele der Symptome treten auch bei anderen Demenzerkrankungen auf.<sup>[47]</sup>

Weltweit wird die Diagnose nach dem Kriterienkatalog des *National Institute of Neurological and Communicative Disorders – Alzheimer Disease and Related Disorders Association* gestellt.<sup>[48-49]</sup> Dabei wird in „Unwahrscheinliche AD“, „Vermutliche AD“, „Wahrscheinliche AD“ und „Definitive AD“ unterschieden. Die Einteilung in „Vermutliche AD“ und „Wahrscheinliche AD“ erfolgt aufgrund von neuropsychologischen Tests. Durch diese Tests lassen sich kognitive Störungen, die ersten klinischen Anzeichen der AD, feststellen.<sup>[47-49]</sup> Diese kognitiven Störungen werden durch die Abnahme der Hirnsubstanz (Atrophie) aufgrund des Absterbens von Nervenzellen hervorgerufen.<sup>[50-51]</sup> Der Krankheitsprozess beginnt jedoch schon Jahre zuvor, auch wenn die Betroffenen noch keine Symptome zeigen.<sup>[47, 52]</sup> Die AD entsteht durch die Bildung von Proteinaggregaten, den sogenannten extrazellulären Amyloiden-Plaques und den intrazellulären Neurofibrillenbündeln (*neurofibrillary tangles*, NFTs), innerhalb des Gehirns (Abbildung 6).<sup>[50, 52-53]</sup> Die Anwesenheit der Amyloiden-Plaques und NFTs wird heutzutage vorwiegend immer noch nur durch eine Hirngewebsuntersuchung bestimmt. Folglich kann die endgültig Diagnose der „definitiven AD“ nur *post mortem* durch die Obduktion des Patienten gestellt werden.<sup>[47-48, 53]</sup>

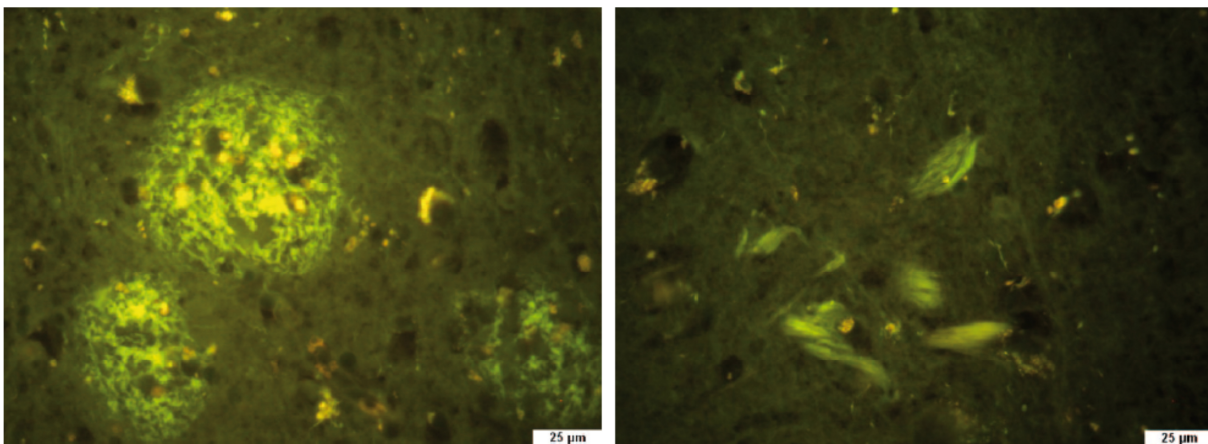


Abbildung 6: Histopathologische Färbung: Gehirnschnitt mit extrazellulären amyloiden Plaques (links) und intrazellulären NFTs (rechts) in der Fluoreszenzfärbung mit Thioflavin S. Gewebe: Hippocampus; Patient: Männlich, 80 Jahre, AD.<sup>[54]</sup> Mit freundlicher Genehmigung von Kieser.<sup>[54]</sup>

Die Proteinablagerungen sind bereits in der Frühphase der Erkrankung vorhanden.<sup>[52]</sup> Für eine frühzeitige und eindeutige Diagnostik ist es daher wichtig, die Amyloiden-Plaques und NFTs bereits vor den ersten Symptomen zu detektieren. Mit Hilfe der nicht invasiven Positronen-Emissions-Tomographie<sup>[55]</sup> (PET) und der Einzelphotonen-Computertomographie<sup>[56-57]</sup> (*single photon emission computed tomography*, SPECT) lassen sich die Proteinaggregate durch radioaktive Substanzen bildlich sichtbar machen. Beide Verfahren sind jedoch apparativ aufwendig, teuer und wegen der hohen Strahlenbelastung für eine routinemäßige Vorbeugeuntersuchung nicht geeignet.<sup>[50, 55-57]</sup>

Vor einigen Jahren wurden Amyloide-Plaques und NFTs in der Retina von Mäusen und Menschen nachgewiesen. Dies gibt Hoffnung für neue nicht invasive Diagnoseverfahren, da die Retina von Menschen *in vivo* mühelos untersucht werden kann.<sup>[58-59]</sup> Zum Beispiel könnten durch die konfokale Laser-Retina-Ophthalmoskopie mittels selektiv-bindenden Fluoreszenzmarkern die amyloiden Plaques und NFTs schnell und kostengünstig nachgewiesen werden.<sup>[60-61]</sup>

### 1.2.2 Pathogenese der AD

Die histopathologischen Merkmale der AD sind die extrazellulären amyloiden Plaques und die intrazellulären Neurofibrillenbündel. Beide Pathologien stehen im Zusammenhang mit der Störung synaptischer Übertragungswege, welche zum Absterben der Neuronen und zur Gehirnatrophie führen. Mitte der 1980er konnte gezeigt werden, dass die amyloiden Plaques aus Amyloid- $\beta$ -(A $\beta$ )-Peptiden bestehen.<sup>[62-63]</sup> Der endoproteolytische Abbau des transmembranen  $\beta$ -Amyloiden-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP) führt zur Bildung von A $\beta$ -Peptiden unterschiedlicher Länge. Das membranverankerte APP wird in verschiedenen Geweben des Organismus, in der Peripherie und im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert, gleichwohl die Expression im ZNS am höchsten ist.<sup>[50]</sup> APP wird in Spleiß-Varianten verschiedener Länge exprimiert. Alle Varianten können zu den A $\beta$ -Peptiden abgebaut werden.<sup>[50]</sup> Die genaue physiologische Funktion von APP ist bis heute nicht geklärt, obwohl es mit der Bildung von Synapsen in Verbindung gebracht wird.<sup>[50, 64]</sup> APP kann durch drei verschiedene Proteasen, der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und der  $\gamma$ -Sekretase gespalten werden. Je nach vorliegender Sekretase wird das APP durch den nicht-amyloiden oder dem amyloiden Weg abgebaut (Abbildung 7).<sup>[50, 65-67]</sup>

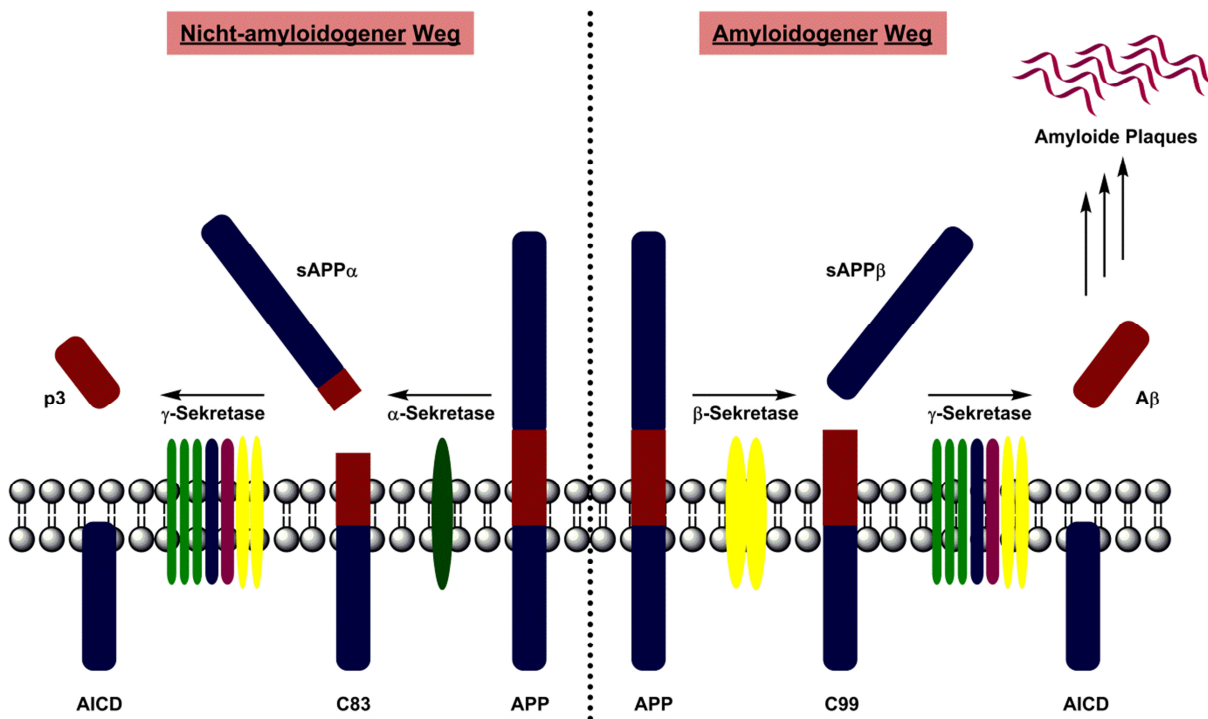


Abbildung 7: Schematische Darstellung des nicht-amyloidogenen und amyloidogenen APP-Abbaus.

sAPP $\alpha/\beta$  = Durch die  $\alpha/\beta$ -Sekretase abgespaltene, N-terminale Domäne des APPs; C83/C99 = 83 / 99 Aminosäuren langes, C-terminales Fragment; AICD = Intrazelluläre Domäne des APPs; A $\beta$  = Amyloid- $\beta$ -Peptide, p3 = Kürzeres, nicht-toxisches A $\beta$ -Peptid. In Anlehnung an LaFerla et al.<sup>[66]</sup>

Erfolgt die Spaltung von APP zuerst durch die  $\alpha$ -Sekretase, so wird der nicht-amyloidogene Weg durchlaufen. Dieser ist nicht pathogen und überwiegt bei gesunden Menschen. Die  $\alpha$ -Sekretase spaltet das APP in das wasserlösliche sAPP $\alpha$  und das membrangebundene C-terminale Fragment (CTF $\alpha$  oder C83) mit einer Länge von 83 Aminosäuren. Anschließend wird das C83-Peptid von der  $\gamma$ -Sekretase in das kürzere p3-Peptid prozessiert. Das p3-Peptid ist ein nicht-toxisches A $\beta$ -Peptid, welches rasch weiter abgebaut wird.<sup>[50, 66-67]</sup>

Wird APP jedoch zuerst von der  $\beta$ -Sekretase gespalten, so verläuft der Abbau nach dem pathogenen amyloidogenen Weg. Die  $\beta$ -Sekretase schneidet das APP in das sAPP $\beta$  und das membrangebundene C-terminale Fragment (CTF $\beta$  oder C99) mit einer Länge von 99 Aminosäuren. Das in der Membran verankerte C99-Peptid wird wiederum von der  $\gamma$ -Sekretase weiter umgesetzt. Durch die proteolytische Spaltung entstehen die intrazelluläre Domäne des APPs (*APP intracellular domain*, AICD) und A $\beta$ -Peptide unterschiedlicher Länge. Bedingt durch die Position an der die  $\gamma$ -Sekretase schneidet, sind die A $\beta$ -Peptide entweder 42, 40, 38, 37 oder weniger Aminosäuren lang. Mit 80-90% wird dabei vorwiegend das A $\beta_{40}$ -Peptid (40 Aminosäuren lang) gebildet. Mit 5-10% folgt das A $\beta_{42}$ -Peptid (42 Aminosäuren lang). Den restlichen

---

Anteil machen kürzere Peptide wie A $\beta$ <sub>38</sub> oder A $\beta$ <sub>37</sub> und kürzer aus.<sup>[50, 66]</sup> Die A $\beta$ -Peptide bestehen aus einer hydrophilen N-terminalen Domäne (Aminosäuren 1-28) und einer hydrophoben C-terminalen Domäne (Aminosäuren 29-42). Aufgrund ihres größeren hydrophoben Charakters neigen vor allem die A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptide zur Aggregation.<sup>[50, 66, 68]</sup> Sie aggregieren zuerst zu größeren Oligomeren, gefolgt von Fibrillen und schließlich den Amyloiden-Plaques.<sup>[50, 66, 69-72]</sup>

Das zweite pathologische Merkmal der AD sind die intrazellulären Neurofibrillenbündel. Die NFTs bestehen hauptsächlich aus Tau. Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP), welches vorwiegend innerhalb der neuronalen Axone des ZNS zu finden ist. MAPs kontrollieren die Stabilität der Mikrotubuli, indem sie an diese binden. Entlang der Mikrotubuli findet der axonale Transport statt, welcher Voraussetzung für das Funktionieren der Neuronen ist. Die Stabilität der Mikrotubuli ist essentiell für intakte Neuronen.<sup>[50]</sup> Das wichtigste MAP ist das Tau-Protein, welches im nativen Zustand wasserlöslich und ungefaltet ist.<sup>[50, 73]</sup> Das humane Tau-Protein wird in sechs Isoformen exprimiert. Innerhalb der C-terminalen Domäne besitzen alle Isoformen drei oder vier sich wiederholende Einheiten zu je 31 Aminosäuren, den sogenannten mikrotubulibindenden Domänen. Unter physiologischen Bedingungen können circa 30 der 79 Ser-/Thr-Reste als Phosphorylierungsstellen fungieren.<sup>[50, 73]</sup> Partiiell phosphoryliertes Tau bindet an die Mikrotubuli. In einem dynamischen Gleichgewicht zwischen freien und mikrotubuligebundendem Tau werden die Mikrotubuli stabilisiert und somit der axonale Transport gewährleistet.<sup>[50, 74]</sup>

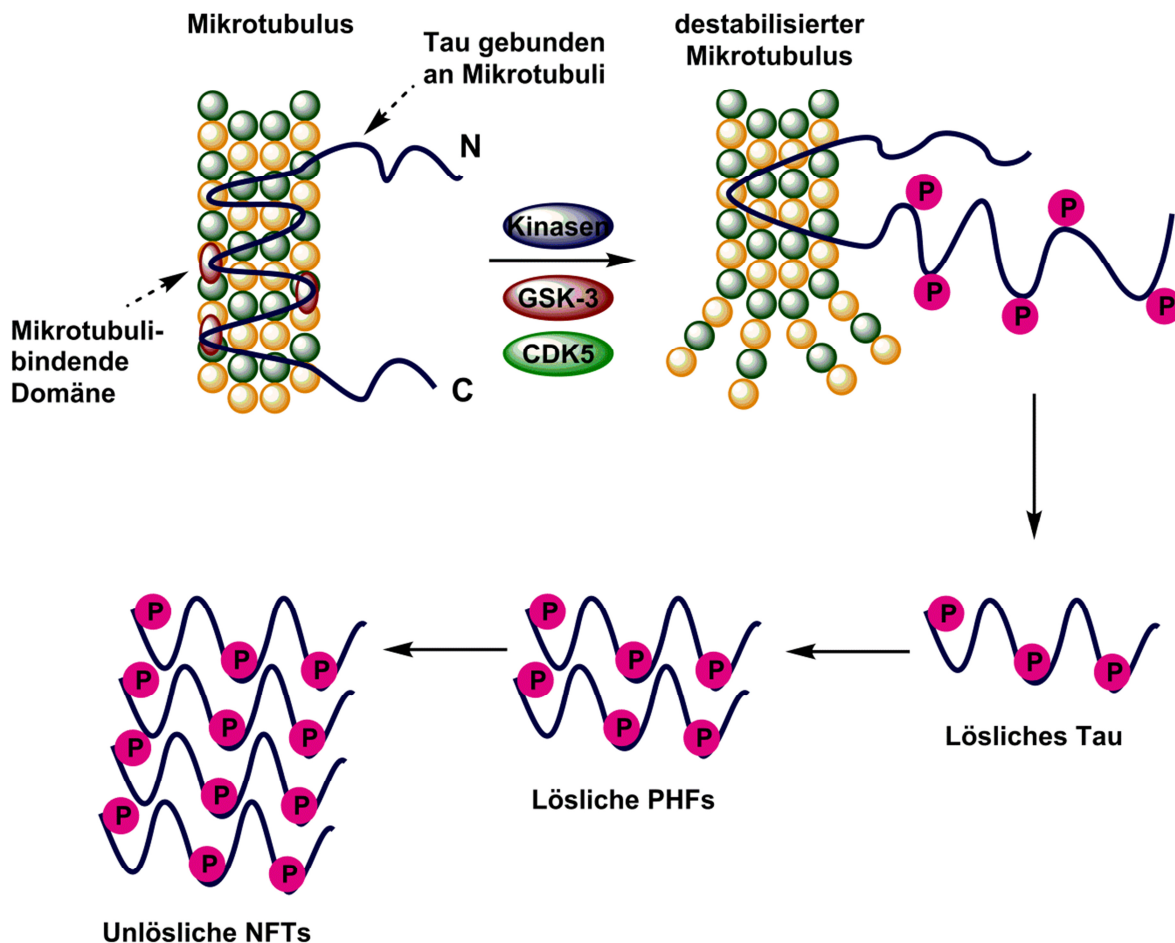


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Bildung von Neurofibrillenbündeln (NFTs). P = Phosphatrest; GSK-3 = Glycogen Synthase-3; CDK5 = Cyklin-abhängige Kinase 5; PHFs = Paarige helikale Filamente. In Anlehnung an Brunden *et al.*<sup>[75]</sup>

Durch die anormale Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, vor allem innerhalb der mikrotubulibindenden Domänen, werden die Wechselwirkungen zwischen Tau und den Mikrotubuli gestört (Abbildung 8). Diverse Kinasen werden für die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins verantwortlich gemacht. Die Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3), die cyklin-abhängige Kinase 5 (CDK5), die extrazelluläre signalregulierte Kinase 2 (ERK2) und die *dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A* (DYRK1A) können Tau an den AD-spezifischen Stellen phosphorylieren.<sup>[50, 73, 76-77]</sup> Die hyperphosphorylierten Tau-Proteine lösen sich von den Mikrotubuli ab, wodurch die Mikrotubuli destabilisiert werden und schließlich depolymerisieren. Als Folge wird der axonale Transport gestört und es kommt zur Rückbildung der Neuronen. Die abgelösten, hyperphosphorylierten Tau-Proteine aggregieren zu paarigen-helikalen Filamenten (PHFs) und im weiteren Verlauf zu den wasserunlöslichen NFTs.<sup>[50, 75]</sup>

### 1.2.3 Gegenwärtige Behandlung der AD

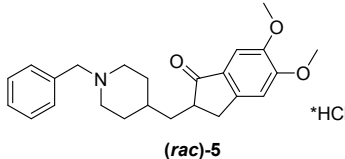
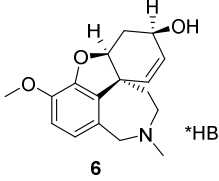
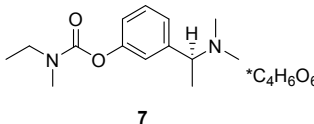
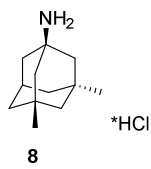
Die AD ist bis heute nicht heilbar und führt unweigerlich zum Tod. Die derzeit zugelassenen Wirkstoffe können die Symptome nur lindern, nicht aber die Krankheit stoppen oder heilen.<sup>[50, 78]</sup> Gegenwärtig werden Antidementiva, Antidepressiva und Neuroleptika in der medikamentösen Behandlung verabreicht.<sup>[79-80]</sup>

Antidementiva werden gegen die Hauptsymptome der AD, wie dem Gedächtnisverlust, eingesetzt. Acetylcholin und Glutamat steuern bei gesunden Menschen die Lern- und Gedächtnisvorgänge. Bereits in der Frühphase der AD sind Defizite im Acetylcholin-Neurotransmittersystem zu beobachten. Das Absterben von hauptsächlich cholinergen Nervenzellen führt dazu, dass Acetylcholin nicht mehr ausreichend produziert wird. Die Acetylcholinesterase (AChE) ist an den Synapsen für den Abbau von Acetylcholin zuständig. Durch deren Hemmung wird der Abbau des Acetylcholins verzögert und somit die Acetylcholin-Konzentration an den Synapsen erhöht.<sup>[81]</sup> Für die Behandlung von milder bis mittelschwerer AD sind die Acetylcholinesterase-Inhibitoren, **Donepezil Hydrochlorid ((*rac*)-5)**, **Galantamin Hydrobromid (6)** und **Rivastigmin Tartrat (7)**, zugelassen (Tabelle 6).<sup>[50, 78-80, 82]</sup>

Bei der AD ist die Glutamatkonzentration zwischen den Nervenzellen anhaltend erhöht. Dies führt zu einer endlosen Erregung der Nervenzellen und schließlich zur sogenannten Exzitotoxizität. Dabei löst die permanente Überreizung einen Selbstzerstörungsmechanismus der Nervenzellen und somit ihren Tod aus.<sup>[34, 43]</sup> Damit die Nervenzellen vor einem übermäßigen, neuronenschädigenden Glutamat Einstrom geschützt werden, wird der Glutamat-Antagonist **Memantin Hydrochlorid (8)** eingesetzt (Tabelle 6). **Memantin Hydrochlorid (8)** ist ein nicht-kompetitiver N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Antagonist, der bei Patienten im mittleren bis schweren Krankheitsstadium als Monotherapie oder in Kombination mit einem Acetylcholinesterase-Inhibitor gegeben wird.<sup>[78-80, 83]</sup>



Tabelle 6: Zugelassene Medikamente für die symptomatische Behandlung der AD.<sup>[82-83]</sup>

Wirkstoff	Markenname/ Unternehmen	Struktur	Wirkweise
Donepezil Hydrochlorid	Aricept®/ Eisai Inc. <sup>[84]</sup>	 (rac)-5	Achetylcholinesterase- Inhibitor
Galantamin Hydrobromid	Razadyne®/ Janssen Pharmaceuticals NV <sup>[85]</sup>	 6	Achetylcholinesterase- Inhibitor
Rivastigmin Tartrat	Exelon®/ Novartis Pharmaceuticals Corp. <sup>[86]</sup>	 7	Achetylcholinesterase- Inhibitor
Memantin Hydrochlorid	Namenda®/ Forest Pharmaceuticals Inc. <sup>[87]</sup>	 8	NMDA-Rezeptor- Antagonist

Antidepressiva werden bei Alzheimer-Patienten häufig zusätzlich zur Therapie von Unruhezuständen, Ängsten und durch die AD verursachte Depressionen eingesetzt. Neuroleptika können gegen Begleitsymptome, wie Wahnvorstellungen oder Aggressivität helfen. Aufgrund der hohen Nebenwirkungen werden diese jedoch eher selten und nicht längerfristig eingesetzt.<sup>[78-80]</sup> Daneben können nicht-medikamentöse Therapien, wie beispielsweise Ergotherapie, Reminiszenztherapie oder Selbst-Erhaltungstherapie, die Gemütslage und den klinischen Gesamteindruck der Patienten verbessern.<sup>[79-80, 88]</sup>

#### 1.2.4 Krankheitsbeeinflussende Therapieansätze der AD

Die molekularen Grundlagen und Prozesse, welche die AD auslösen sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Daher ist eine frühzeitige Diagnose und Heilung der AD derzeit noch nicht möglich. Die Entwicklungen neuer Therapieansätze stützen sich entweder auf die Amyloid- oder die Tau-Hypothese. In der Arzneimittelentwicklung der letzten zwei Jahrzehnte dominierte vorwiegend die Amyloid-Hypothese. Diese

führt die Entstehung der AD auf die übermäßige Bildung von A $\beta$ -Peptiden und deren Akkumulation zu extrazellulären A $\beta$ -Plaques zurück.<sup>[50, 65, 69, 89]</sup> Innerhalb des amyloidogenen APP-Abbauwegs soll die AD an verschiedenen Ansatzpunkten beeinflusst werden. Mögliche Therapieansätze sind dabei Sekretase-Inhibition und -Modulation, aktive und passive A $\beta$ -Immuntherapie sowie die Veränderung des A $\beta$ -Flusses an der Blut-Hirn-Schranke (Tabelle 7).<sup>[89-91]</sup>

APP wird im amyloidogenen Weg von der  $\beta$ -Sekretase, auch als BACE (*beta-site APP-cleaving enzyme*, BACE) bezeichnet, und der  $\gamma$ -Sekretase in das pathogene A $\beta$ -Peptid gespalten.<sup>[89, 91]</sup> Um die A $\beta$ -Produktion zu hemmen, befinden sich derzeit mehrere BACE-Inhibitoren in laufenden Phase 2/3 Studien (Tabelle 7).<sup>[89, 92]</sup> Eine vollständige Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase ist jedoch nicht möglich, da sie auch in den Notch-Signalweg involviert ist. Durch die Modulation der  $\gamma$ -Sekretase, soll das Verhältnis zwischen A $\beta$ <sub>38</sub>-, A $\beta$ <sub>40</sub>- und A $\beta$ <sub>42</sub>-Bildung hin zu einer vermehrten Bildung des nichttoxischen A $\beta$ <sub>38</sub> verschoben werden. Dennoch konnten bisher bei noch keinem  $\gamma$ -Sekretase-Modulator positive Resultate in der klinischen Phase erzielt werden.<sup>[93-94]</sup>

Bei der aktiven Immuntherapie mit Peptid-Fragmenten, welche A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptide nachahmen, soll im Körper eine Immunantwort in Form von anti-A $\beta$ -Antikörpern hervorgerufen werden.<sup>[89]</sup> Aufgrund von auftretenden Autoimmunreaktionen wurden viele Projekte eingestellt. Einer der wenigen noch in der klinischen Entwicklung gegenwärtigen aktiven Impfstoffe ist **CAD106**, ein Gemisch aus A $\beta$  1-6 Peptiden.<sup>[89, 92]</sup>

Das Konzept der passiven Immuntherapie hingegen wird noch von vielen Pharmaunternehmen verfolgt. Die passive Impfung erfolgt mit monoklonalen Antikörpern, welche spezifisch verschiedene Epitope von A $\beta$ -Monomeren, Oligomeren oder Fibrillen binden.<sup>[89-90]</sup>

Einige Studien zeigten eine Störung der Blut-Hirn-Schranke bei AD-Patienten. Dies könnte dazu beitragen, dass im Vergleich zu gesunden Gehirnen unlösliches A $\beta$  in AD-Gehirnen stark erhöht ist. RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) und LRP1 (*lipo-protein receptor-related protein 1*) sind zwei A $\beta$ -Transportproteine, welche den A $\beta$ -Transport an der Blut-Hirn-Schranke regulieren. RAGE ist für den A $\beta$ -Zufluss ins Gehirn und LRP1 für das Ausschleusen von A $\beta$  aus dem Gehirn verantwortlich.<sup>[62, 95-96]</sup> Die Hemmung von RAGE und die Aktivierung von LRP1 könnten die A $\beta$ -Konzentration im Gehirn verringern.<sup>[89, 96]</sup>



Tabelle 7: Auswahl an Wirkstoffen basierend auf der Amyloid-Hypothese.<sup>[89, 92]</sup>

Wirkstoff / Unternehmen	Therapieansatz	Aktuelle klinische Studie
<b>Verubecestat (MK-8931)</b> / <i>MSD Sharp &amp; Dohme</i>	BACE-Inhibitor	Phase II/III <sup>[97]</sup> Phase III <sup>[98]</sup>
<b>AZD3293 (LY3314814)</b> / <i>AstraZeneca, Eli Lilly &amp; Co.</i>	BACE-Inhibitor	Phase II/III <sup>[99]</sup>
<b>CAD106</b> / <i>Novartis Pharmaceuticals</i>	A $\beta$ - Aktive Impfung	Phase II/III <sup>[100]</sup>
<b>Solanezumab</b> / <i>Eli Lilly &amp; Co.</i>	A $\beta$ - Passive Impfung	Phase III <sup>[101-102]</sup>
<b>Crenezumab (MABT5102A)</b> / <i>Genentech</i>	A $\beta$ - Passive Impfung	Phase II <sup>[103]</sup>
<b>Azeliragon (TTP488)</b> / <i>vTv Therapeutics LLC</i>	RAGE-Inhibitor	Phase III <sup>[104]</sup>

Die Arzneimittelentwicklung der letzten Jahre hat sich hauptsächlich auf die Reduzierung der amyloidogenen Plaques fokussiert. Da jedoch keiner der geprüften Wirkstoffe eine deutliche Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten innerhalb der Phase III der klinischen Prüfung erreichen konnte, schaffte es bisher kein Wirkstoff zur Marktreife. Der jahrelange ausbleibende Erfolg vieler klinischer Studien lässt an dem therapeutischen Nutzen der Amyloid-Hypothese zweifeln. Zugleich konnte bisher auch kein direkter Zusammenhang zwischen Amyloiden-Plaques im ZNS und der kognitiven Leistungsfähigkeit gefunden werden.<sup>[50, 105-106]</sup> Dies unterstützt auch die sogenannte Nonnen-Studie der Universität von Kentucky mit 678 Nonnen im Alter von 75 bis 107 Jahren.<sup>[107-108]</sup> Etwa ein Drittel der Frauen mit postmortal nachweisbaren schweren amyloiden Ablagerungen zeigten zum Zeitpunkt des Todes eine normale intellektuelle Leistungsfähigkeit auf. Umgekehrt waren einige Nonnen zu Lebzeiten dement, *post mortem* waren bei ihnen jedoch keine Amyloid Ablagerungen im Gehirn zu finden.<sup>[107-108]</sup>

Ein weitaus engerer Zusammenhang besteht zwischen der Menge an intrazellulären NFTs, dem Verlust an Neuronen und somit dem Grad der AD.<sup>[109]</sup> Die Tau-Hypothese führt die Entstehung der AD auf die Hyperphosphorylierung von Tau, dessen Aggregation zu NFTs und der dadurch initiierten Destabilisierung der Mikrotubuli

zurück.<sup>[50, 65, 89, 106]</sup> Untersuchungen an transgenen Mäusen haben ebenfalls gezeigt, dass nicht nur die zytotoxischen NFTs sondern vor allem auch die PHFs und andere hyperphosphorylierte und lösliche Tau-Aggregate Neurodegeneration induzieren.<sup>[110-112]</sup> Bei normalen Neuronen, welche murines oder humanes Tau exprimieren, initiieren Aβ-Peptide deren Degeneration. Bei Tau-*knockout* (engl. *knockout* = außer Gefecht setzen) Mäusen bleibt die Degeneration der Neuronen bei Aβ-Exposition jedoch aus.<sup>[106, 113-114]</sup> Daher wird vermutet, dass Tau eine zentrale Rolle innerhalb der Aβ-initiierten Neurodegeneration spielt und so beide Pathologien miteinander verbindet. Demzufolge wird derzeit bevorzugt anormales Tau als primärer Verursacher und Treiber des Alzheimerkrankheitsprozesses angesehen.<sup>[114]</sup>

Tau-basierte Strategien wurden in den letzten Jahre in der Medikamentenforschung stark vernachlässigt, sodass erst wenige Wirkstoffe in der klinischen Prüfung sind (Tabelle 8). Aufgrund der neuen Erkenntnisse über die Krankheitsabfolge werden momentan Tau-basierte Therapieansätze verstärkt erforscht und vorangetrieben. Mögliche Therapieansätze basierend auf der Tau-Hypothese sind die Hemmung der Hyperphosphorylierung und Aggregation von Tau, Mikrotubuli-Stabilisatoren sowie aktive und passive Tau-Immuntherapien.<sup>[76, 90-91, 105-106]</sup>

Durch das Verhindern der Tau-Aggregation sollen die Nervenzellen vor dem Verfall geschützt werden. Die entwickelten Substanzen sollen die Zusammenlagerung von Tau verhindern oder bereits entstandene Tau-Aggregate depolymerisieren.<sup>[34, 76, 90, 106, 115]</sup> Als einziger tau-basierter Therapieansatz ist hierfür ein Wirkstoff (LMTX) bereits in Phase III der klinischen Prüfung (Tabelle 8).<sup>[90, 116-117]</sup>

Es besteht ein starker Zusammenhang zwischen Phosphorylierung von Tau und der Bildung von NFTs. Folglich wird nach Inhibitoren der für die Tau-Hyperphosphorylierung verantwortlichen Kinasen als potentiell Therapeutikum gesucht.<sup>[76, 96, 106]</sup> GSK-3, MARK 1, CDK 5 und einige andere Kinasen können Tau an den AD-spezifischen Phosphorylierungsstellen *in vivo* phosphorylieren.<sup>[73, 76, 106, 118-119]</sup>

Vor allem dem Einfluss der GSK-3 auf die Hyperphosphorylierung von Tau wird eine große Bedeutung im Krankheitsprozess der AD zugeschrieben.<sup>[120-122]</sup> Verschiedene GSK-3-Inhibitoren, wie beispielsweise **Tideglusib**,<sup>[123-124]</sup> waren bereits in späteren klinischen Studien.<sup>[106]</sup> Neue Kenntnisse über die Bedeutung der GSK-3 Isoformen innerhalb der AD geben Hoffnung auf neue aussichtsreiche Inhibitoren (siehe Abschnitt 1.3.7).

Die Ablösung von hyperphosphoryliertem Tau führt zur Destabilisierung der Mikrotubuli, wodurch der axonale Transport gestört und die Neuronen zurückgebildet werden. Durch Mikrotubuli-stabilisierende Stoffe soll die Destabilisierung und Depolymerisierung der Mikrotubuli verhindert und letztlich die Neuronen geschützt werden.<sup>[76, 106]</sup>

Die Tau-Immuntherapie verfolgt das analoge Konzept der A $\beta$ -Immuntherapie.<sup>[89]</sup> Bei der aktiven Tau-Immuntherapie sollen mit synthetisierten Tau-Peptidsequenzen Antikörper gegen pathologisch veränderte Tau-Formen (anormal phosphoryliertes Tau, PHFs und NFTS) im Körper hervorgerufen werden.<sup>[76, 105-106]</sup> Bei der passiven Tau-Immuntherapie werden wiederum monoklonale Antikörper verwendet, welche spezifisch an anormale Tau-Epitope binden und so die Aggregate auflösen sollen.<sup>[76, 105-106]</sup> Das vermehrte Scheitern der A $\beta$ -Immuntherapie-Studien zeigt jedoch, wie wichtig eine genaue Ausrichtung der Immuntherapie auf die tatsächliche pathogene Spezies ist.<sup>[106]</sup> Bei der Tau-Hypothese wird immer noch diskutiert, ob die Neurotoxizität bereits von den löslichen Tau-Spezies hervorgerufen wird und die NFTs eher zum Schutz des Gehirns dienen.<sup>[106, 125-127]</sup> Als Hinweis können Winterschlafende Tiere dienen, bei denen reversible NFTs zum Gehirnschutz vor der Kälte gebildet werden.<sup>[127-128]</sup> Die Tau-Immuntherapie befindet sich vorwiegend noch in der präklinischen Entwicklung. Ein aktiver Tau-Impfstoff befindet sich in Phase I der klinischen Prüfung.<sup>[106, 129]</sup>

Tabelle 8: Auswahl an Wirkstoffen basierend auf der Tau-Hypothese.<sup>[130]</sup>

Wirkstoff / Unternehmen	Therapieansatz	Aktuelle klinische Studie
<b>LMTX (TRx0237)</b> / <i>TauRx Therapeutics Ltd</i>	Tau-Aggregationshemmer	Phase III <sup>[116-117]</sup>
<b>TPI287</b> / <i>Cortice Biosciences</i>	Mikrotubuli-Stabilisator	Phase I <sup>[131]</sup>
<b>AADvac-1</b> / <i>Axon Neuroscience SE</i>	Tau - Aktive Impfung	Phase I <sup>[129]</sup>

### 1.3 Die Glykogen Synthase Kinase-3 als Target der AML und AD

Die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) ist eine prolangerichtete (P+4) Serin/Threonin Kinase, welche zu der CMGC Kinasefamilie (benannt nach den Anfangsbuchstaben einiger Unterfamilien: *Cyclin-dependent kinases* (CDKs), *Mitogen-activated protein kinases* (MAP kinases), *Glycogen synthase kinases* (GSK) and *CDK-like kinases*) gehört.<sup>[132-134]</sup> Bereits 1980 wurde die GSK-3 aus den Skelettmuskeln eines Kaninchens isoliert und ihr eine Schlüsselfunktion in der Glykogensynthese zugeschrieben. Der Tatsache, dass die GSK-3 die Glykogen Synthase phosphoryliert und dadurch inaktiviert, verdankt sie ihren Namen.<sup>[135-136]</sup>

Inzwischen sind zahlreiche weitere Substrate der GSK-3 bekannt (Tabelle 9). Dazu gehören Stoffwechsel- und Signalproteine wie APP oder Axin, Strukturproteine wie Tau und Transkriptionsfaktoren wie  $\beta$ -Catenin. Dies ermöglicht es der GSK-3 an vielen Signalwegen, wie beispielsweise dem Wnt-, dem Hedgehog- oder dem Insulin/Akt-Signalweg, mitzuwirken und diese zu beeinflussen. In diesen Signalwegen stellt die GSK-3 eine Schlüsselkomponente dar.<sup>[137-139]</sup> Somit ist die GSK-3 als multifunktionales Enzym in der Regulierung vieler zellulärer Prozesse, wie der Zellproliferation, der Stammzellen Erneuerung, der Apoptose, der embryonalen Entwicklung, dem Metabolismus, der Differenzierung und der Zellmotilität, beteiligt.<sup>[137, 140]</sup> Aufgrund dieser wichtigen regulatorischen Funktionen der GSK-3, wird angenommen, dass eine anormal gesteigerte Aktivität bzw. Überexpression der GSK-3 bei der Entstehung von Krankheiten, wie Diabetes, Alzheimer und Krebs beteiligt ist. Allerdings ist die GSK-3, als therapeutisches *Target* umstritten, da durch ihre Inhibition möglicherweise verschiedene zelluläre Prozesse gestört werden würden. Nichtsdestotrotz ist die GSK-3 ein vielversprechendes *Target* für die Entwicklung von Medikamenten und für die Aufklärung der molekularen Grundlagen für die oben beschriebenen tödlichen Krankheiten.<sup>[140]</sup>

Tabelle 9: Beispiele für mögliche Substrate der GSK-3.<sup>[139]</sup>

Stoffwechsel- und Signalproteine	Strukturproteine	Transkriptionsfaktoren
AcetylCoA Carboxylase	DF3/MUC1	AP-1 (Jun Familie)
Amyloid Precursor Protein	Dynamin-like Protein	-Catenin
APC	Kinesin-light chain	C/EBP
ATP-Citrat-Lyase	MAP1B	CREB-1
Axin	MAP2	GATA4
Protein Ci( <i>Cubitus interruptus</i> )	NCAM	Glucocorticoid-Rezeptor
cAMP-abhängige Proteinkinase	Ninein	HIF-1
Cyclin D1	Tau	HSF-1
Cyclin E	Tolekin (KRP)	Mash1
eIF-2B Translationaler Faktor		MITF
Glykogen Synthase		NFATc
hnRNP		NF- B (p65/p105)
Insulin-Rezeptor-Substrat 1		Notch
Basisches Myelinprotein		p53
NGF Rezeptor		TCF
Nucleoporin p62		
P21		
PSEN1		
Proteinkinase A (RII Subunit)		
Proteinphosphatase 1		
Proteinphosphatase-Inhibitor-2		
Pyruvat Dehydrogenase		

### 1.3.1 Isoformen der GSK-3

In Säugetierzellen wird die GSK-3 in zwei eng verwandten Isoformen, der GSK-3 $\alpha$  und der GSK-3 $\beta$ , ubiquitär exprimiert.<sup>[141-143]</sup> Die komplette Struktur umfassend besitzen beide Isoformen eine Sequenzidentität von 84%.<sup>[140]</sup> Innerhalb ihrer katalytischen Domäne weisen sie sogar eine Sequenzhomologie von 98% auf. Außerhalb dieser Domäne zeigen ihre Aminosäuresequenzen jedoch signifikante Unterschiede. Dabei ist die GSK-3 $\alpha$  (51 kDa, 483 Aminosäuren) durch eine zusätzliche glycinreiche N-terminale Domäne größer als die GSK-3 $\beta$  (47 kDa, 433 Aminosäuren). Innerhalb der C-terminalen Domäne teilen beide Isoformen nur eine Sequenzidentität von 36%.<sup>[134, 137, 141, 144]</sup>

Obwohl die beiden Isoformen strukturell sehr ähnlich sind, besitzen sie nicht die gleichen Funktionen in der Zelle. So kann der Verlust der einen Isoform nicht durch die andere ersetzt werden, da eine zellspezifische Expression der Isoformen vorliegt.<sup>[145-147]</sup> Die GSK-3 $\alpha$  wird bevorzugt im Gehirn, der Lunge, der Leber, den Eierstöcken und den Hoden exprimiert. Während die GSK-3 $\beta$  vor allem im Gehirn, der Lunge und der Leber gefunden wurde.<sup>[142]</sup> Der homozygote *Knockout* von GSK-3 $\beta$  bei Mäusen (GSK-3 $\beta^{-/-}$ ) führt aufgrund von schwerer Leberdegeneration zu embryonaler Letalität.<sup>[146]</sup> Im Gegensatz zu den GSK-3 $\beta^{-/-}$  Mutanten, welche vor der Geburt sterben, sind GSK-3 $\alpha$  *Knockout*-Mäuse (GSK-3 $\alpha^{-/-}$ ) lebensfähig und weisen dazu noch eine erhöhte Glucose- und Insulinsensitivität, begleitet mit einer reduzierten Fettmasse, auf.<sup>[147]</sup> Es wird vermutet, dass es zwischen beiden Isoformen auch Funktionsüberschneidungen gibt, dennoch liegen vorwiegend Gewebe- und Isoform-spezifische Funktionsunterschiede vor. Die genauen Funktionen der beiden Isoformen sind bis heute nicht geklärt.<sup>[140]</sup> Daher ist die Diskussion über die jeweiligen Beiträge der beiden Isoformen, GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ , zur Pathogenese diverser Krankheiten noch nicht abgeschlossen. Isoform-spezifische Inhibitoren können bei der Aufklärung der entsprechenden Funktionen beiden Isoformen helfen.

### 1.3.2 Struktur der GSK-3

Im Jahr 2001 wurden von drei verschiedenen Arbeitsgruppen die ersten Strukturanalysen der GSK-3 $\beta$  veröffentlicht.<sup>[133-134, 148]</sup> Die Struktur von GSK-3 $\alpha$  wurde allerdings bisher kristallographisch noch nicht gelöst.

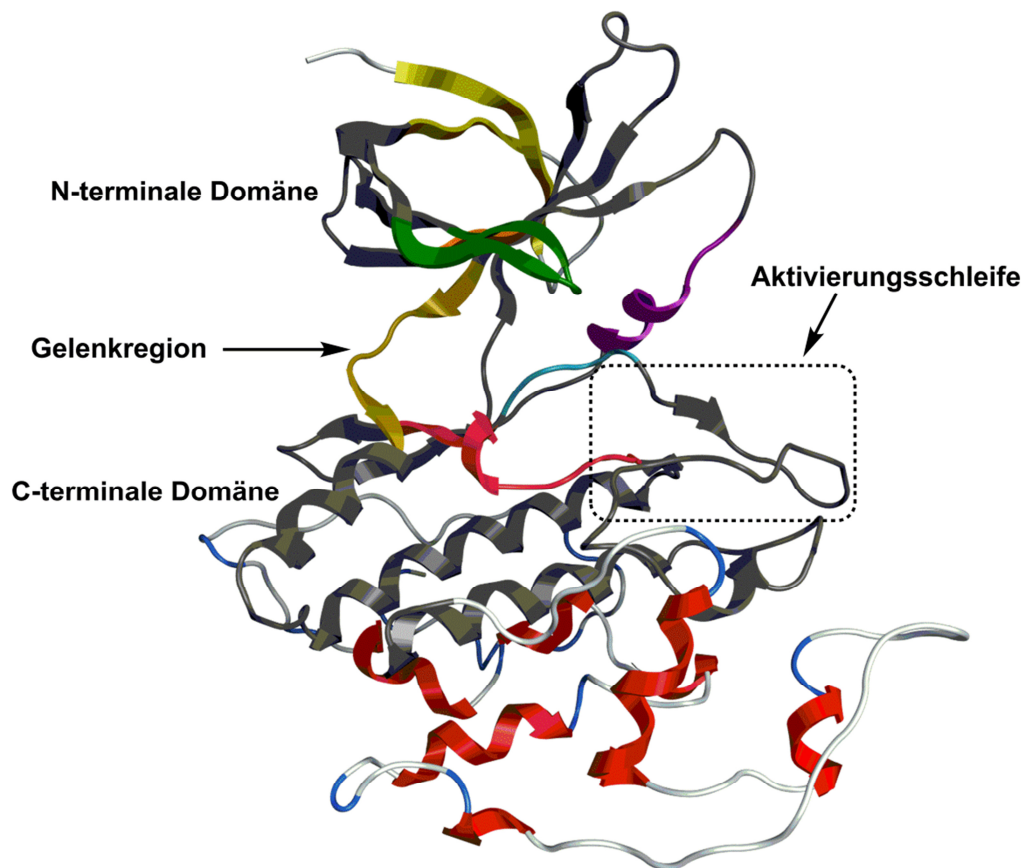


Abbildung 9: Tertiärstruktur der GSK-3 $\beta$  (PDB Code: 3F88). Verwendete Software: *Molecular Operating Environment (MOE) 2014.0901*.

Die GSK-3 $\beta$  besitzt die typische zwei-Domänen-Konformation einer Kinase, mit einer N-terminalen  $\beta$ -Strang-Domäne zwischen den Aminosäureresten 25 - 138 und einer C-terminalen  $\alpha$ -helikalen Domäne zwischen den Aminosäuren 139 - 343 (Abbildung 9). Zwischen der  $\beta$ -Strang Domäne und der  $\alpha$ -helikalen Domäne befindet sich die ATP-Bindungstasche, welche durch die flexible Gelenk-Region (*hinge region*, gelb in Abbildung 9) und der Glycin-reichen Schleife (*glycine-rich loop* oder *P-loop*) markiert ist.<sup>[133]</sup> Die Glycin-reiche Schleife (grün in Abbildung 9) besitzt eine konservierte GlyXGlyXXGly-Sequenz (X = beliebige Aminosäure). Benachbart zur ATP-Bindungstasche liegt die Substratbindungstasche, welche von der Aktivierungsschleife (*activation loop*) umgeben ist. Die Aktivierungsschleife ist

begrenzt durch das DFG-Motiv (Asp200, Phe201, Gly202, cyan in Abbildung 9) und dem APE-Motiv (Ala224, Pro225, Glu226). Die Asparaginsäure bzw. das Aspartat-Ion des DFG-Motivs bildet zu der wichtigsten katalytischen Aminosäure Lys85 eine Salzbrücke und ist daher am Phosphattransfer beteiligt.<sup>[149]</sup>

Bei den meisten Kinasen wird die Aktivität über die Orientierung des DFG-Motivs geregelt. Befindet sich dieses in der DFG-*in*-Konformation, liegt die Kinase im enzymatisch aktiven Zustand vor. Befindet sich dieses hingegen in der DFG-*out*-Konformation, so liegt die Kinase in einem inaktiven Zustand vor.<sup>[150]</sup> Im Gegensatz zu den meisten Kinasen befindet sich die Aktivierungsschleife der humanen GSK-3 $\beta$  (hGSK-3 $\beta$ ) auch in ruhenden Zellen immer in einer aktiven Konformation. Die Aktivierungsschleife liegt sorgfältig auf der Seite der  $\alpha$ -helikalen Domäne und macht so die Substratbindungstasche sowie die kleine benachbarte Phosphatbindungstasche (bestehend aus Arg96, Arg180 und Lys205) zugänglich. Folglich können die üblichen Kinase-Regulationsmodi nicht greifen. Die GSK-3 gilt daher als konstitutiv aktiv.<sup>[133-134]</sup>

Die  $\beta$ -Strang Domäne besteht aus 7 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern. Die  $\beta$ -Faltblätter Nummer 2-6 bilden ein  $\beta$ -Fass ( $\beta$ -barrel), welches jedoch durch eine kurze  $\alpha$ -Helix (lila in Abbildung 9) zwischen  $\beta$ -Faltblatt Nummer 4 und 5 unterbrochen wird. Diese Helix ist in allen Kinasen konserviert. Die beiden in der Helix enthaltenen Aminosäuren Arg96 und Glu97 spielen eine entscheidende Rolle im Katalysemechanismus der Kinase. Dabei ist Arg96 wichtig für die Ausrichtung der beiden Domänen. Glu97 zeigt in Richtung der aktiven Tasche und ist katalytisch am Phosphattransfer aufgrund einer Salzbrücke mit Lys85 beteiligt.<sup>[133-134]</sup>

Neben der ATP-Bindungstasche befindet sich die Axin/Frat-Bindungstasche, welche die beiden Strukturproteine Axin und Frat (humane Form der GBP) bindet und somit die Bildung der Proteinkomplexe im Wnt-Signalweg ermöglicht.<sup>[149]</sup> Durch Dockingstudien konnten außerdem vier allosterische Bindetaschen auf der Enzymoberfläche identifiziert werden.<sup>[151]</sup>



### 1.3.3 Regulierung der GSK-3

Als konstitutiv aktive Kinase liegt die GSK-3 auch in ruhenden Zellen in einer aktiven Konformation vor.<sup>[152]</sup> Folglich kann die Aktivität der GSK-3 nicht über die Lage des DFG-Motivs geregelt werden.

Der Mechanismus zur Regulierung der GSK-3 ist noch nicht vollständig verstanden und wird daher noch stark diskutiert. Es wird vermutet, dass eine exakte Steuerung der GSK-3 durch die Kombination aus Phosphorylierung, *geprimten* (engl. *primed* = vorphosphoryliert) Substraten, subzellulärer Lokalisation sowie der Interaktion mit verschiedenen GSK-3 bindenden Proteinen erfolgt.<sup>[132, 137]</sup>

Der Aktivitätszustand der GSK-3 wird häufig durch den Phosphorylierungsgrad der Substrate reguliert. Damit die Substrate von der GSK-3 umgesetzt werden können, müssen die meisten Substrate von anderen Kinasen im Voraus an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert worden sein. Es handelt sich hierbei um sogenannte *geprimte* Substrate. *Geprimte* Substrate weisen eine P+4 Erkennungssequenz, Ser/Thr-XXX-pSer/pThr (Ser/Thr = Serin bzw Threonin, welches von GSK-3 phosphoryliert werden soll; X = beliebige Aminosäure; pSer/pThr = phosphoryliertes Serin bzw. Threonin), auf. Der Phosphatrest des *geprimten* Substrats wird von der Phosphatbindetasche der GSK-3 erkannt und gebunden. Dadurch wird die Interaktion des Substrats mit der Substratbindetasche erleichtert und das Substrat wird ca. 100- bis 1000-mal schneller phosphoryliert.<sup>[120, 132-134, 144, 149, 153-154]</sup>

Die Enzymaktivität kann durch Phosphorylierung der GSK-3 aktiviert oder inhibiert werden. Durch Phosphorylierung der Tyrosinreste, Tyr279 bei GSK-3 $\alpha$  und Tyr216 bei GSK-3 $\beta$ , kommt es zu einer Aktivitätssteigerung.<sup>[132, 137, 155-156]</sup> Über den zugrunde liegenden Mechanismus wird noch diskutiert. Es wird angenommen, dass die Tyrosin-Phosphorylierung entweder durch die GSK-3 selbst (Autophosphorylierung) oder durch eine bestimmte, noch unbekannte Tyrosin-Kinase erfolgt. Außerdem wird diskutiert, ob unphosphoryliertes Tyr279/216 den Zugang für *geprimte* Substrate blockiert und erst durch eine Konformationsänderung aufgrund der erfolgten Tyrosinphosphorylierung die Substrate an die GSK-3 binden können.<sup>[132, 137, 148, 155, 157]</sup>

Werden andererseits die N-terminalen Serinreste, Ser21 bei GSK-3 $\alpha$  und Ser9 bei GSK-3 $\beta$ , phosphoryliert, so wird die Kinaseaktivität signifikant reduziert.<sup>[152, 158]</sup> Durch verschiedene Wachstumsfaktoren kann eine schnelle und reversible Zunahme der

Serin-Phosphorylierung durch diverse Kinasen hervorgerufen werden. Im Anschluss an die Phosphorylierung der N-terminalen Serine 21 bzw. 9 kommt es zu einer Autoinhibition der GSK-3, indem ein Abschnitt der N-terminalen Aminosäuresequenz als *geprimtes* Pseudosubstrat die eigene Substratbindungstasche blockiert (Abbildung 10). Dadurch wird die Bindung von *geprimten* Substraten verhindert und führt so zu einer Abnahme der GSK-3-Aktivität.<sup>[133-134, 159]</sup> Nimmt jedoch die Konzentration an *geprimtem* Substrat zu wird die Autoinhibition kompetitiv wieder aufgehoben. Die Phosphorylierung von Ser21/9 kann durch viele verschiedene Kinasen, wie beispielsweise Akt/PKB (Akt = PKB = Proteinkinase B), Isoformen der PKC (α-, β-Isoformen der Proteinkinase C) oder PKA (Proteinkinase A), erfolgen. Einige Kinasen phosphorylieren nur isoform-spezifisch. So phosphoryliert die PKC nur die GSK-3β und nicht die GSK-3α, während es bei der IKK-1 (*IκB-related kinase-1*, IKK-1) umgekehrt ist.<sup>[160-162]</sup> Zudem phosphorylieren alle Isoformen der Akt-Kinase die GSK-3β, wobei aber nur die Akt2 auch die GSK-3α phosphoryliert.<sup>[161, 163]</sup> Viele verschiedene Signalwege sind somit an der Kontrolle der GSK-3-Aktivität beteiligt. Durch die Identifizierung weiterer isoform-spezifischer Regulierungsmechanismen könnte die Rolle beider Isoformen in den Signalwegen besser aufgeklärt werden.<sup>[132, 137, 164]</sup>

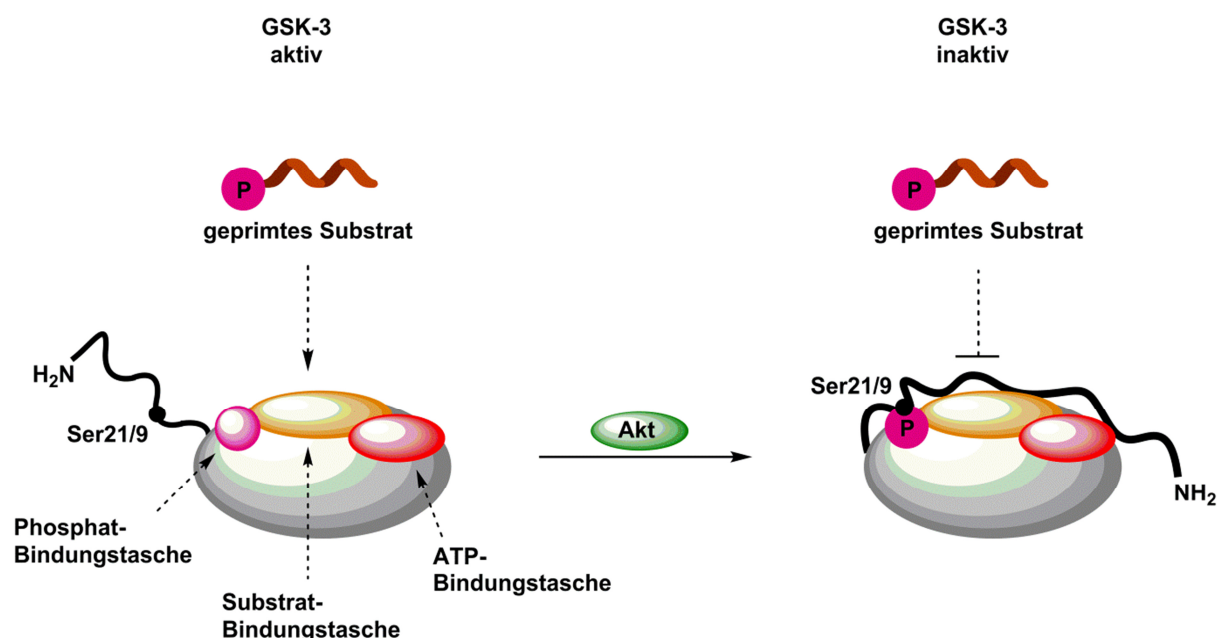


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Autoinhibitionsmechanismus der GSK-3 hervorgerufen durch die Phosphorylierung von Ser21 (GSK-3α) bzw. Ser9 (GSK-3β). In Anlehnung an Neumann.<sup>[34]</sup>

Über die Mechanismen, welche die intrazelluläre Lokalisierung der GSK-3 bestimmen ist noch nicht viel bekannt. Dennoch ist es ersichtlich, dass durch die Regulierung der

---

intrazellulären Lokalisierung der GSK-3 auch deren Zugang zu Substraten kontrolliert werden kann. Die GSK-3 ist vorwiegend im Cytosol, aber auch im Nukleus und in den Mitochondrien vorhanden. Innerhalb der Mitochondrien ist die GSK-3 sogar aktiver als im ausgedehnten Zytoplasma.<sup>[132, 137, 165]</sup> Innerhalb der Mitochondrien reguliert die Akt-Kinase durch Phosphorylierung die GSK-3 Aktivität, ohne dabei die mitochondriale GSK-3-Konzentration zu ändern.<sup>[132, 166]</sup>

Die GSK-3-Konzentration ist im Nukleus nicht konstant. Sie ändert sich dynamisch und fluktuiert in Abhängigkeit der Phase des Zellzyklus. Innerhalb der S-Phase der Zelle ist die Konzentration am höchsten und kann innerhalb der Apoptose frühzeitig rasant ansteigen.<sup>[132, 167-168]</sup> Dadurch ist die GSK-3 in der Lage Genexpressionen durch die Regulierung von diversen Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise GATA-4, c-Myc oder p53 zu beeinflussen.<sup>[137]</sup>

Es wurde beobachtet, dass sich die GSK-3 $\beta$  zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern hin und her bewegt, während die GSK-3 $\alpha$  vom Nukleus ausgegrenzt wird.<sup>[132, 169-170]</sup> Die GSK-3 $\alpha$  unterscheidet sich durch eine zusätzliche glycinreiche N-terminale Domäne von der GSK-3 $\beta$ . Nach Entfernen der zusätzlichen N-terminalen Domäne konnte auch die GSK-3 $\alpha$  im Zellkern gefunden werden.<sup>[132, 170]</sup> Des Weiteren wurde beobachtet, dass es durch Fehlen des N-Terminus von GSK-3 $\beta$  zu einer Abnahme dieser Isoform innerhalb des Nukleus kommt.<sup>[132, 169]</sup> Folglich wird angenommen, dass der intrazelluläre Transport von GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  von der posttranslationalen Modifikation der N-terminalen Reste abhängig ist. Dadurch kann es zu isoenzym-spezifischen Transporten und Anhäufungen kommen, wodurch isoenzym-kontrollierte Phosphorylierungen von Substraten stattfinden können.<sup>[34, 132, 169-170]</sup>

Innerhalb des kanonischen Wnt-Signalwegs wird die GSK-3 unabhängig von Serin- oder Tyrosin-Phosphorylierungen kontrolliert. Stattdessen erfolgt die Regulierung nur an Hand von Protein-Protein-Interaktionen infolge der Bildung von Proteinkomplexen. GSK-3-bindende Proteine wie Axin oder Frat regulieren dabei den Zugang zu dem Substrat  $\beta$ -Catenin.<sup>[132, 137, 153, 171]</sup>

### 1.3.4 Die Rolle der GSK-3 im Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg spielt in der Regulierung von Proliferation, Differenzierung und Zelltypfestlegung eine entscheidende Rolle, indem er die Genexpression beeinflusst.<sup>[172]</sup> Infolgedessen kontrolliert der Wnt-Signalweg viele essentielle biologische Prozesse, wie die Embryogenese oder die Selbsterneuerung adulter Stammzellen. Dabei hat der Wnt-Signalweg Einfluss auf die Stammzellen des hämatopoetischen Systems, des Gehirns, der Haut, des Darmepithels und der Haarfollikel.<sup>[172-173]</sup>

Die GSK-3 ist in beiden, dem kanonischen und dem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg beteiligt. Im weiteren Verlauf wird nur der kanonische Wnt-Signalweg genauer beschrieben und nur noch als Wnt-Signalweg bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass beide Isoformen, GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ , innerhalb des Wnt-Signalweges funktionell redundant sind. Das heißt sie besitzen höchstwahrscheinlich sehr ähnliche Funktionen innerhalb des Signalweges, die genauen Rollen der Isoform wurden jedoch noch nicht geklärt.<sup>[174-175]</sup>

Der Wnt-Signalweg steuert über die Regulierung der cytosolischen Konzentration des Protoonkoproteins  $\beta$ -Catenin die Expression von Zielgenen (Abbildung 11). In Abwesenheit des Wnt-Signals wird  $\beta$ -Catenin kontinuierlich in einem Multiproteinkomplex für den Abbau im Proteasom markiert, wodurch dessen Konzentration gering gehalten wird.<sup>[172]</sup> Dabei bindet zuerst das Strukturprotein Axin an die GSK-3. In Zellen sind kontinuierlich weniger als 5-10% der GSK-3 mit Axin verbunden.<sup>[176-177]</sup> Neben der GSK-3 bindet Axin auch den Tumor-Suppressor *Adenomatös Polyposis Coli* (APC), die Caseinkinase 1 (CK1) und  $\beta$ -Catenin.<sup>[178-180]</sup> Innerhalb des gebildeten Proteinkomplexes phosphoryliert CK1 das Ser45 von  $\beta$ -Catenin, wodurch eine *geprimte* Erkennungsstelle für GSK-3 entsteht.<sup>[132, 181-183]</sup> Anschließend phosphoryliert die GSK-3 das *geprimte*  $\beta$ -Catenin nacheinander an Thr41, Ser37 und Ser33. Die vierfache Phosphorylierung führt zur Polyubiquitinierung des  $\beta$ -Catenins und schließlich zu dessen Abbau durch das Proteasom.<sup>[132, 172, 181, 183-184]</sup> Folglich kann kein  $\beta$ -Catenin in den Zellkern wandern. In Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin wirken die Transkriptionsfaktoren der TCF/Lef-Familie als Transkriptionsrepressoren, indem sie mit weiteren Co-Repressoren wie der Groucho-Familie (Grg/TLE) wechselwirken. Die Transkription der Wnt-Zielgene wird somit blockiert.<sup>[172, 185-186]</sup> Außerdem wurde beobachtet, dass die GSK-3 mit Grg/TLE Teil

des Co-Repressor-Komplexes ist und somit die Repression der Wnt-Zielgene unterstützt.<sup>[187-188]</sup>

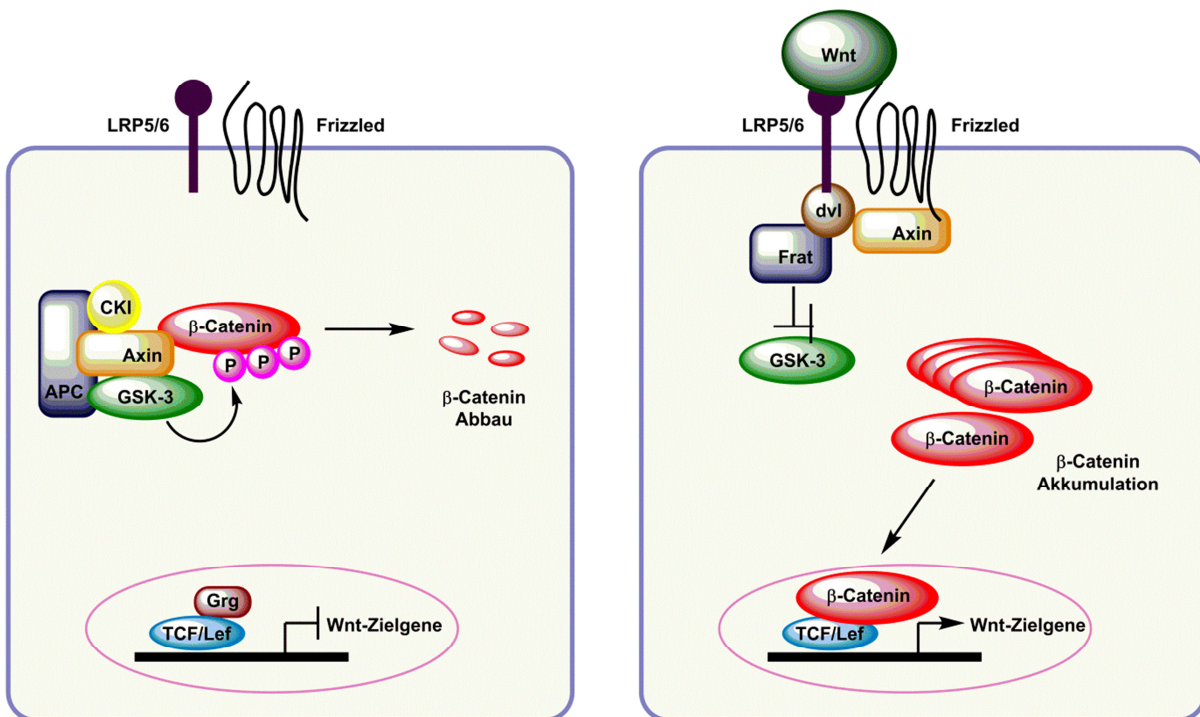


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs. Links: In Abwesenheit des Wnt-Signals kommt es zum kontinuierlichen Abbau von  $\beta$ -Catenin und zur Hemmung der Transkription von Wnt-Zielgenen. Rechts: In Anwesenheit des Wnt-Signals kommt es zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und zur Aktivierung der Genexpression im Zellkern. In Anlehnung an *Reya* und *Clevers*.<sup>[173]</sup>

Bindet hingegen das Wnt-Signalprotein gleichzeitig an den *Frizzled*-Rezeptor (Fzd) und den Co-Rezeptor LRP5/6 führt dies zur Aktivierung des Proteins *Dishevelled* (dvl) (Abbildung 11).<sup>[137, 173, 189]</sup> Dvl wechselwirkt mit dem GSK-3-bindenden Protein Frat. Zusammen stören sie die Bindung von Axin zu GSK-3, indem Frat an die GSK-3 bindet und der Axin-GSK-3-Komplex aufgelöst wird. Aufgrund der Komplexbildung mit Frat wird nun die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin gestoppt.<sup>[153, 190]</sup> Als Folge stabilisiert sich  $\beta$ -Catenin und spaltet sich von dem Proteinkomplex ab. Es kommt zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma, welche die Translokation von unphosphoryliertem  $\beta$ -Catenin in den Nukleus hervorruft.<sup>[137]</sup> Innerhalb des Nukleus bindet  $\beta$ -Catenin mit den Transkriptionsfaktoren der TCF/Lef-Familie an die DNA.<sup>[191-192]</sup> Durch die Interaktion der TCFs mit  $\beta$ -Catenin werden die Co-Repressoren verdrängt und die TCFs werden zu Transkriptionsaktivatoren.<sup>[172]</sup> Dadurch wird die Transkription von Wnt-Zielgenen erhöht.<sup>[137]</sup> Zu den Wnt-Zielgenen gehören Gene zur Regulation der Zellproliferation oder auch zur Kontrolle der Apoptose. Eine erhöhte Expression dieser Gene könnte zur Entstehung von Krebs beitragen.<sup>[172-173]</sup> Es konnte



jedoch gezeigt werden, dass innerhalb des Nukleus auch die GSK-3 vorkommt und mit  $\beta$ -Catenin einen Komplex bilden kann und somit die  $\beta$ -Catenin-abhängige Transkription verringert wird.<sup>[188, 193]</sup>

### 1.3.5 Die GSK-3 in der Tumorregulation

Die GSK-3 spielt innerhalb der Krebserkrankungen unterschiedliche Rollen, welche bis heute noch nicht komplett verstanden sind. Dabei kann die GSK-3 entweder als Tumor-Promoter oder als Tumor-Suppressor fungieren.<sup>[137, 174, 194-195]</sup>

Hinweise, dass die GSK-3 als Tumor-Promoter und so zur Tumorentstehung und Tumorprogression beiträgt, liefert die beobachtete GSK-3 Überexpression in verschiedenen Krebsarten, wie Bauchspeicheldrüsen-, Nieren-, Eierstock-, Dickdarm-, oder Leberkarzinome.<sup>[137, 195-197]</sup>

Bei vielen anderen Krebsarten zeigt sich aber auch ein entgegengesetzter Einfluss der GSK-3. Viele Wnt-Zielgene sind Protoonkogene, die bei der Krebsentstehung direkt involviert sind. Durch die Beteiligung der GSK-3 am Wnt-Signalweg kann diese die Transkription dieser Protoonkogene herabsetzen. Es ist erwiesen, dass die GSK-3 bei Brust- und Hautkrebs als Tumor-Suppressor dient.<sup>[137, 195, 198-199]</sup>

Die Beteiligung der GSK-3 an der Regulation des Wnt-Signalwegs hat die Verwendung von GSK-3-Inhibitoren umstritten gemacht. Es wird befürchtet, dass die Inhibition der GSK-3 zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führt und deshalb potenziell kanzerogen ist. Dies ist jedoch stark umstritten. Der GSK-3-Inhibitor Lithium wird schon seit mehr als 60 Jahren zur Behandlung von bipolaren Störungen verwendet. Die Lithium-Therapie wurde bereits bei zahlreichen Patienten langfristig über mehrere Jahrzehnte eingesetzt, ohne dabei ein erhöhtes Krebsrisiko zu verursachen.<sup>[174, 195, 200]</sup> Eine vollständige Inhibition der GSK-3 sollte dennoch vermieden werden, da auch therapeutische Lithium-Dosen die GSK-3 nur partiell inhibieren. Es wird davon ausgegangen, dass eine Inhibition von nicht mehr als 25% ausreicht, um die pathologische GSK-3-Aktivität im kranken Gewebe hinreichend abzuschwächen, während im gesunden Gewebe die GSK-3 nicht beeinträchtigt wird.<sup>[137, 201]</sup>

Eine moderate Inhibition der GSK-3 im Menschen ist folglich für die Behandlung von verschiedenen Krebsarten denkbar. Das therapeutische Potenzial der GSK-3-Inhibitoren scheint dabei jedoch stark von dem Gewebetyp des Tumors abzuhängen.<sup>[137, 174, 194]</sup> Innerhalb des Wnt-Signalwegs sind beide GSK-3-Isoformen

---

funktionell redundant.<sup>[174-175]</sup> Dennoch sind ihre physiologischen Funktionen häufig auch von dem vorliegenden Gewebetyp abhängig.<sup>[195]</sup> Isoform-spezifische Inhibitoren könnten daher individuelle und erfolgreiche Krebstherapien ermöglichen.

### 1.3.6 Die GSK-3 $\alpha$ als therapeutisches Target der akuten myeloischen Leukämie

Die GSK-3 ist nicht nur für solide Tumore ein vielversprechendes therapeutisches *Target*, sondern auch für Leukämien.

Bei der AML wurden Fehlregulationen des Wnt-Signalweges nachgewiesen.<sup>[202]</sup> Infolgedessen treten verstärkt Resistenzen gegenüber der Chemo- und Strahlentherapie auf, wodurch die Patienten eine schlechtere Prognose besitzen. Die auftretenden Resistenzen werden mit einer Überexpression der GSK-3 und einer verstärkten  $\beta$ -Catenin Aktivität in Verbindung gebracht. Durch die Inhibition der GSK-3 könnte die Empfindlichkeit der resistenten Zellen gegenüber der Chemo- und Strahlentherapie verstärkt werden.<sup>[194-195, 203]</sup>

Die GSK-3 Inhibition hat nicht nur Einfluss auf den Erfolg der Chemotherapie sondern auch direkt auf den Krankheitsprozess. Für eine krankheitsbeeinflussende Therapie ist vor allem eine isoform-spezifische Inhibition wichtig. Durch unabhängige genetische und chemische *Screenings* identifizierten *Stegmaier et al.* die GSK-3 $\alpha$  als ein mögliches *Target* der AML.<sup>[204]</sup> Mit Hilfe von *Screenings* zweier Substanzbibliotheken und einem shRNA (*short hairpin RNA*, shRNA) *Screening* wurden Veränderungen der Genexpression, welche zur Differenzierung der AML-Zellen führen, erfasst. Dabei induzierte die spezifische Inhibition der GSK-3 $\alpha$  die Differenzierung von zwei unterschiedlichen AML-Zelllinien. *In vitro* Tests haben gezeigt, dass durch die spezifische Hemmung der GSK-3 $\alpha$  auch das Zellwachstum sowie die Zellproliferation der Leukämiezellen reduziert werden. Außerdem wurde beobachtet, dass durch die GSK-3 $\alpha$ -Inhibition die Leukämiezellen ihre Fähigkeit der Koloniebildung in Methylcellulose verlieren und ihre Apoptose eingeleitet wird. *In vivo* Studien an NSG- (*NOD scid gamma*)-Mäusen bewiesen eine anti-AML Aktivität. Durch den Verlust der GSK-3 $\alpha$  wurde das Fortschreiten der AML verhindert und die Überlebensrate der Mäuse verbessert.

Die GSK-3 $\alpha$  konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand von Zellkulturuntersuchungen als therapeutisches *Target* der AML bestätigt werden.<sup>[205]</sup> Infolgedessen wird  $\alpha$ -selektiven GSK-3-Inhibitoren ein großes Potential für die Behandlung der AML

zugeschrieben. Durch GSK-3 $\alpha$ -spezifische Inhibitoren könnte die gegenwärtige aggressive Standard-Chemotherapie durch eine effizientere zielgerichtete Therapie der AML abgelöst werden.<sup>[204]</sup>

### 1.3.7 Die GSK-3 $\alpha$ als therapeutisches Target der AD

Die GSK-3 wird mit beiden Pathologien der AD, den NFTs und amyloiden Plaques in Verbindung gebracht. Infolgedessen wurde die sogenannte „GSK-3 Hypothese der AD“ aufgestellt. Gemäß dieser Hypothese ist die GSK-3 das Bindeglied zwischen beiden Pathologien, da eine übermäßige GSK-3 Aktivität nicht nur mit der Tau-Hyperphosphorylierung sondern auch mit einer erhöhten A $\beta$ -Produktion assoziiert wird.<sup>[140, 206-207]</sup> Beide Isoformen der GSK-3 werden im neuronalen Gewebe von AD-Patienten übermäßig exprimiert.<sup>[206, 208]</sup> Daher wird beiden Isoformen eine wesentliche Rolle in der AD Pathogenese zugeschrieben. Dennoch konnte die spezifische Beteiligung der jeweiligen Isoform innerhalb des Krankheitsprozesses noch nicht genau aufgeklärt werden.<sup>[207]</sup>

In den letzten Jahren wurde die Rolle der  $\alpha$ -Isoform trotz umfangreicher GSK-3 $\beta$  Studien kaum untersucht. Studien weisen jedoch darauf hin, dass der Einfluss der GSK-3 $\alpha$  auf die Entstehung und molekularen Mechanismen der AD von größerer Bedeutung ist.<sup>[209]</sup>

Im Gegensatz zu anderen Wirbeltieren fehlt bei diversen Vogelarten das GSK-3 $\alpha$  Gen. Das heißt sie sind naturgemäß GSK-3 $\alpha$  *Knockout*-Tiere, bei denen nur die GSK-3 $\beta$  exprimiert wird. Es wurde beobachtet, dass das Fehlen der GSK-3 $\alpha$  die Tau-Phosphorylierung in Vögeln beeinflusst. So wurde im Vergleich zu Hirngewebeproben von Mäusen bei Proben von Vögeln eine signifikant niedrigere Tau-Phosphorylierung an der bekannten GSK-3-Phosphorylierungsstelle, Ser396, gefunden.<sup>[210]</sup> Die Reduktion der GSK-3 vermittelten Tau-Phosphorylierung sowie eine verminderte Tau-Akkumulation konnten bei GSK-3 $\alpha$  *Knockout*-Mäusen (GSK-3 $\alpha^{-/-}$ ) bestätigt werden.<sup>[207, 210]</sup> Die Reduktion der Tau-Phosphorylierung und -Akkumulation konnte auch durch die Behandlung mit verschiedenen GSK-3-Inhibitoren beobachtet werden.<sup>[211-212]</sup>

Durch siRNA (*short interfering RNA*, siRNA) und shRNA *Knockdown*-Experimente konnte der Einfluss der GSK-3 $\alpha$  auf die A $\beta$ -Bildung beleuchtet werden. Unter dem Einsatz von siRNA und shRNA gegen die GSK-3 $\alpha$  konnte eine Abnahme der



---

Produktion von A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub> bewirkt werden. Dazu wurde gezeigt, dass die GSK-3 $\alpha$  die A $\beta$ -Produktion durch die Stimulation der  $\gamma$ -Sekretase, ohne den Notch-Signalweg zu beeinflussen, fördert.<sup>[207, 213]</sup>

In neusten Studien von *Dunning et al.* wurde die GSK-3 $\alpha$  als Interaktionspartner von A $\beta$ <sub>42</sub> identifiziert. Dabei bindet die GSK-3 $\alpha$  mit einer hohen Bindungsaffinität an A $\beta$ <sub>42</sub> Monomere und Oligomere.<sup>[214]</sup> Mittels der Konfokalmikroskopie konnte dabei die Co-Lokalisation von A $\beta$ <sub>42</sub> und GSK-3 $\alpha$  in Neuriten von ausgereiften murinen Nervenzellen nachgewiesen werden. Außerdem zeigten sie, dass in Anwesenheit von A $\beta$ <sub>42</sub> die GSK-3 $\alpha$  vermittelte Tau-Phosphorylierung verstärkt wird.<sup>[214]</sup>

Anhand dieser Studien konnte ermittelt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der GSK-3 $\alpha$  und den Pathologien der AD besteht. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für die Aufklärung der molekularen Mechanismen der AD sowie für die Entwicklung krankheitsbeeinflussender Therapien. Infolgedessen wird den GSK-3 $\alpha$ -spezifischen Inhibitoren ein großes Potential für die Behandlung der AD zugeschrieben.

### 1.3.8 Entwicklung von GSK-3-Inhibitoren

GSK-3-Inhibitoren stellen potentielle Wirkstoffe für die Behandlung der AML und AD dar. Vor allem isoform-spezifischen GSK-3-Inhibitoren sind dabei vielversprechend. Für einen erfolgreichen GSK-3-Inhibitor ist daher nicht nur die Selektivität gegenüber anderen Kinasen, wie beispielsweise den CDKs, sondern auch die Isoform-Selektivität zwischen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Form entscheidend. Eine hohe Selektivität wird durch selektive molekulare Interaktionen zwischen Inhibitor und Enzym erreicht. Heutzutage handelt es sich bei dem Großteil der Inhibitoren um *small molecules* (niedermolekulare Moleküle), welche mittels strukturbasiertem Wirkstoffdesigns entwickelt wurden. Mit Hilfe von entsprechenden Computerprogrammen werden dabei Interaktionen des potentiellen Inhibitors mit dem betreffenden Enzym simuliert. Anhand der daraus resultierenden Struktur-Aktivitäts-Beziehungen kann bereits vor der Synthese und der anschließenden Evaluierung abgeschätzt werden, ob eine Aktivität und Selektivität gegenüber dem entsprechenden Enzym erreicht werden kann.<sup>[215-216]</sup> Für einen erfolgreichen Wirkstoff ist auch das Verhalten innerhalb des lebenden Organismus entscheidend. Für die Löslichkeit, Membranpermeation und Bioverfügbarkeit von organischen Molekülen berücksichtigen Chemiker *Lipinski's Rule*

of Five.<sup>[217]</sup> Diese besagt, dass ein Wirkstoff gute Absorptions- und Permeationseigenschaften hat, wenn:

- Nicht mehr als fünf Donoren von Wasserstoffbrückenbindungen (*hydrogen bond donators*, HBD) vorliegen.
- Nicht mehr als zehn Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (*hydrogen bond acceptors*, HBA) vorliegen.
- Die Molekülmasse (M) nicht größer als 500 g/mol ist.
- Der berechnete dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten von Oktanol zu Wasser (ClogP) maximal einen Wert von fünf annimmt.<sup>[217]</sup>

Als potentielle Therapeutika der AD ist es wichtig, dass die GSK-3-Inhibitoren die Blut-Hirn-Schranke durchdringen können. 2010 wurde die sogenannte Multiparameter-Optimierung für das ZNS aufgestellt, welche bei der Abschätzung der Hirngängigkeit möglicher Wirkstoffe hilft (Tabelle 10).<sup>[218]</sup> Wichtige Kenngrößen einer Substanz sind dabei die Lipophilie (ClogP), der Verteilungskoeffizient bei pH 7.4 (clogD), die molekulare Masse (M), der berechnete Wert der *topological polar surface area* (TPSA), die Anzahl an HBD sowie die Säurestärke (pK<sub>a</sub>).<sup>[218]</sup>

Tabelle 10: ZNS-Multiparameter-Optimierung für die Abschätzung der Hirngängigkeit von potentiellen niedermolekularen Wirkstoffen.<sup>[218]</sup>

Parameter	Bevorzugter Bereich	Weniger bevorzugter Bereich
ClogP	≤ 3	> 5
clogD (pH = 7.4)	≤ 2	> 4
M [g/mol]	≤ 360	> 500
TPSA [Å <sup>2</sup> ]	40 < TPSA ≤ 90	20 ≤ TPSA > 120
HBD	≤ 0.5	> 3.5
pKa	≤ 8	> 10

Wirkungsvolle Strategien zur Entwicklung von GSK-3-Inhibition sind die irreversible Inhibition mit kovalent bindenden Inhibitoren und die reversible Inhibition mit ATP-kompetitiven, substratkompetitiven oder allosterischen Inhibitoren.<sup>[219]</sup> Das Konzept der Typ-II-Inhibition, der Stabilisierung der enzymatisch inaktiven DFG-out Konformation, ist bei der humanen GSK-3 aufgrund ihrer konstitutiven Aktivität (siehe Abschnitt 1.3.2) nicht möglich.

Im folgenden Verlauf werden mit Hilfe von Beispielen die verschiedenen Inhibitionsmechanismen, welche für die GSK-3 möglich sind, erläutert.

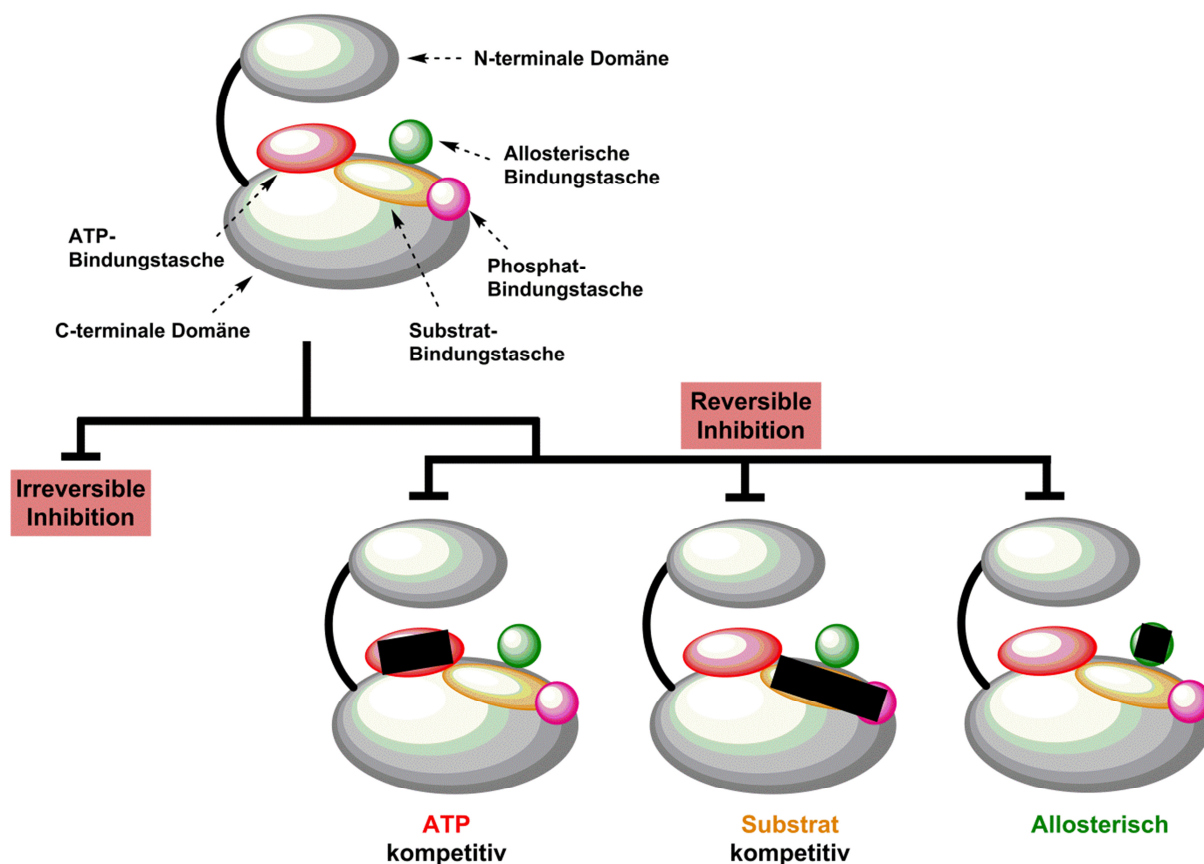


Abbildung 12: Schematische Darstellung der möglichen Inhibitionsmechanismen der GSK-3. Hinweis: Die allosterische Bindungstasche kann auch an einer anderen Stelle der Kinase liegen. ■ = Inhibitor. In Anlehnung an Neumann.<sup>[34]</sup>

Der häufigste Ansatz die GSK-3 zu hemmen ist die Entwicklung von ATP-kompetitiven Inhibitoren (Abbildung 12). ATP-kompetitive Inhibitoren konkurrieren mit der zellulären ATP-Konzentration von 2 bis 10 mM. Das erfordert  $IC_{50}$ -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich, weswegen eine hohe Bindungsaffinität des Inhibitors zu dem Enzym vorliegen muss.<sup>[220-222]</sup> Die ATP-Bindungstaschen aller Kinasen liegen evolutionär bedingt stark konserviert vor.<sup>[223-224]</sup> Damit selbst engste Kinase-Verwandte der GSK-3, wie beispielsweise die CDKs, nicht inhibiert werden, ist vor allem die Selektivität der potentiellen ATP-kompetitiven GSK-3-Inhibitoren entscheidend.<sup>[220, 224]</sup> Zahlreiche ATP-kompetitive GSK-3-Inhibitoren mit unterschiedlichster Potenz und Selektivität sind aus diversen Substanzklassen bereits bekannt. Die erste bekannte Substanzklasse waren vereinfachte Analoga des Staurosporins, die 2,3-Bisarylmalaidine.<sup>[219]</sup> Das kommerziell erhältliche Maleidin-Derivat **SB216763** (9) ist ein selektiver und potenter Inhibitor beider GSK-3

Isoformen (Abbildung 13A). Aufgrund seiner Selektivität gegenüber anderen Kinasen wird **9** in vielen *in vitro* und *in vivo* Studien eingesetzt.<sup>[174, 219, 225]</sup> Durch die Komplexierung von Staurosporin zu einem oktaedrischen Ruthenium-Komplex wurde einer der ersten isoform-spezifischen GSK-3-Inhibitoren,  **$\Lambda$ -OS1 (10)**, entwickelt (Abbildung 13A).  **$\Lambda$ -OS1 (10)** besitzt eine 6.6-fach höhere Selektivität für die  $\alpha$ -Isoform gegenüber der  $\beta$ -Form. Trotz der Kokristallisation von **10** mit der GSK-3 $\beta$  konnte jedoch der Grund für die Selektivität noch nicht aufgeklärt werden.<sup>[219, 226]</sup>

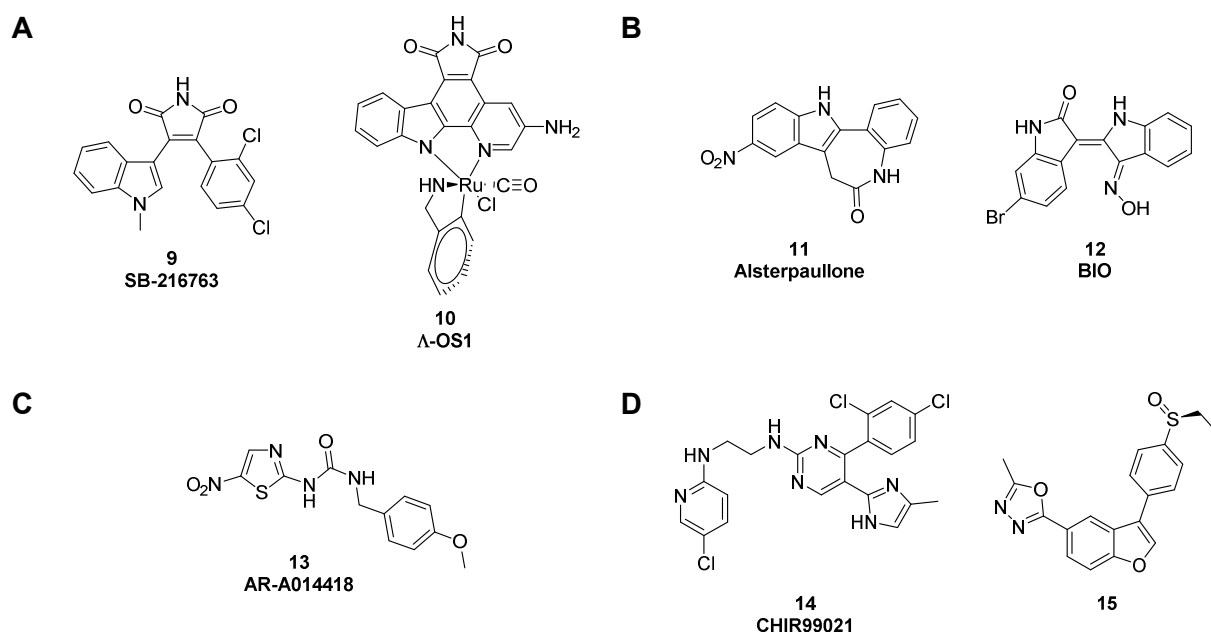


Abbildung 13: Literaturbekannte ATP-kompetitive GSK-3-Inhibitoren. (A) Maleidin-Inhibitoren. (B) Beispiele von Paullon- und Indirubin-Inhibitoren. (C) Benzylharnstoff **AR-A014418 (13)**. (D) Beispiele von Pyrimidin- und Oxadiazol-Inhibitoren.<sup>[219, 225-231]</sup>

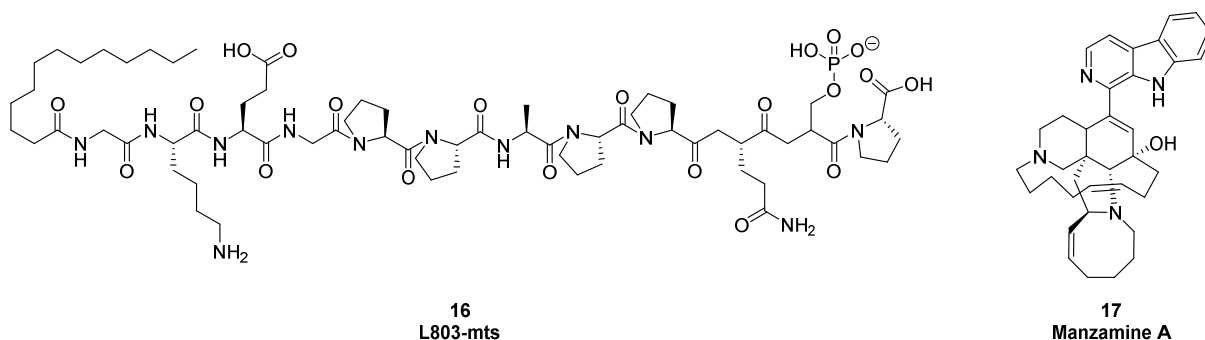
Weitere Substanzklassen ATP-kompetitiver GSK-3-Inhibitoren sind die Paullon- und Indirubin-Derivate (Abbildung 13B). Als Standard-GSK-3-Inhibitor wird das Indirubin-3'-oxim **BIO (12)** in vielen *in vivo* und *in vitro* Studien eingesetzt. Vielen Paullon- und Indirubin-Derivaten fehlt jedoch die Selektivität gegenüber anderen Kinasen, da sie auch gegenüber verschiedenen CDKs aktiv sind.<sup>[228-229, 232]</sup>

Ausgehend von diesen Substanzklassen und mit Hilfe des Computer-gestützten Moleküldesigns konnten neue GSK-3-Inhibitoren mit Aktivitäten im niedrigen nanomolaren Bereich entwickelt werden. 2003 wurde zum ersten Mal eine Kokristallisation eines ATP-kompetitiven Inhibitors **AR-A014418 (13)** mit der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 1Q5K) von *AstraZeneca* veröffentlicht. Durch diese konnten schließlich zentrale Wechselwirkungen zwischen dem Inhibitor und der ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  aufgeklärt werden.<sup>[34, 227, 233]</sup> Die dadurch identifizierten Wechselwirkungen

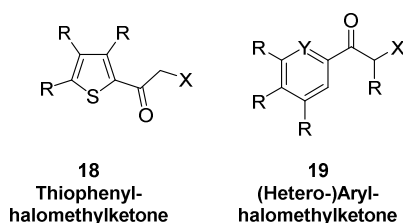
lassen sich in fast allen darauffolgenden GSK-3-Inhibitoren wiederfinden. Zu den neusten GSK-3-Inhibitoren gehören diverse Substanzklassen, wie Pyrimidine, Benzylharnstoffe oder Oxadiazole (Abbildung 13D).<sup>[219]</sup>

Das größte Problem der ATP-kompetitiven GSK-3-Inhibitoren ist die fehlende Selektivität gegenüber anderen Kinasen, da sie alle an die stark konservierte ATP-Bindungstasche binden. Ein möglicher Ansatz, dieses Problem zu umgehen, ist die Störung der Bindung von Enzym und Substrat.<sup>[219]</sup> Substratkompetitive Inhibitoren konkurrieren mit dem Substrat um die Bindungsstelle in der Substratbindungstasche. Der Inhibitor wird vom Enzym nicht umgesetzt und kann daher vom Substrat nicht verdrängt werden.<sup>[234]</sup> Einen möglichen Ansatz stellt dabei die Nachahmung *geprimter* Substrate mit phosphorylierten Peptid-Sequenzen da. Das daraus entwickelte Peptid **L803-mts** (**16**) hat große Beliebtheit als GSK-3-Inhibitor erlangt (Abbildung 14A).<sup>[219, 235]</sup> Ein weiterer substratkompetitiver Inhibitor ist der Naturstoff **Manzamine A** (**17**) (Abbildung 14A). **Manzamine A** (**17**) ist jedoch auch gegenüber weiteren Kinasen aktiv. So ist **Manzamine A** (**17**) sogar ein viel potenterer Inhibitor für CDK5.<sup>[219, 236]</sup>

**A**



**B**



**C**

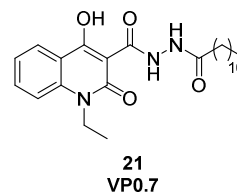
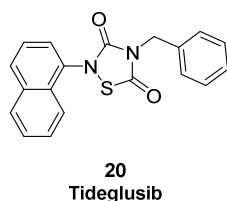


Abbildung 14: Literaturbekannte nicht-ATP-kompetitive Inhibitoren. (A) Substratkompetitive Inhibitoren. (B) Irreversible Inhibitoren. (C) Allosterischer Inhibitor.<sup>[124, 151, 219, 235-237]</sup>

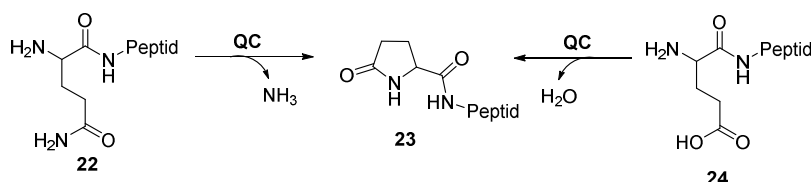
Der am weitesten entwickelte nicht-ATP-kompetitive GSK-3-Inhibitor ist **Tideglusib** (**20**) (Abbildung 14B), welcher sich bereits in der Phase II der klinischen Entwicklung für die Alzheimermedikation befand. **Tideglusib** (**20**) gehört zu der

Klasse der Thiadiazolidione, welche in einer Tasche zwischen Aktivierungsschleife, Glycin-reicher Schleife und C-Loop binden. **Tideglusib (20)** besitzt einen irreversiblen Bindungscharakter.<sup>[124, 219]</sup> Bei der irreversiblen Hemmung bindet der Inhibitor meist kovalent an das Enzym und dissoziiert daher nur sehr langsam oder auch überhaupt nicht mehr von dem Enzym ab. Wohingegen bei der reversiblen Hemmung der Inhibitor von dem Enzym sehr schnell wieder abgespaltet oder verdrängt werden kann.<sup>[234]</sup> Die effizienteste Strategie der kovalenten Kinase-Inhibition ist die Ausnutzung der Reaktivität von Cystein-Resten innerhalb der ATP-Bindungstasche. Diese Strategie wurde erfolgreich bei der Entwicklung der **Halomethylketone (18-19)** als irreversible GSK-3-Inhibitoren genutzt (Abbildung 14B). Diese binden irreversibel an das Cys199, welches am Rand der ATP-Bindungstasche der GSK-3 liegt.<sup>[219, 237-238]</sup>

Allosterische Inhibitoren binden weder an der Substrat- noch der ATP-Bindungstasche, sondern an dem sogenannten allosterischen Zentrum. Durch die Bindung am allosterischen Zentrum erfolgt eine Konformationsänderung des Enzyms. Dadurch verringert sich die Affinität des Enzyms zum Substrat. Das Substrat kann nicht mehr oder schlechter binden und wird folglich nicht mehr umgesetzt.<sup>[34, 234]</sup> Verschiedene allosterische Bindungstaschen wurden mithilfe von Dockingstudien auf der Oberfläche der GSK-3 entdeckt. Der allosterische GSK-3-Inhibitor **VP0.7 (21)** positioniert sich zwischen Arg209 und Thr235 in einer C-terminalen allosterischen Bindungstasche (Abbildung 14C).<sup>[151]</sup>

## 1.4 Die Glutaminyl-Cyclase

Die Glutaminyl-Cyclase (QC) gehört zu der Familie der Aminoacyltransferasen. Die QC katalysiert die intramolekulare Zyklisierung von N-terminalen Glutaminyl- (**22**) und Glutamyl-Resten (**24**) zu dem 5-gliedrigen Lactamring (**23**), dem sogenannten Pyroglutamat (pGlu) (Schema 1).<sup>[239-241]</sup>



Schema 1: Katalysierte Zyklisierung von N-terminalen Glutaminyl- und Glutamatresten durch die QC.

### 1.4.1 Struktur und katalytischer Mechanismus der QC

Die QC wurde sowohl in Pflanzen als auch in Tieren gefunden.<sup>[242]</sup> 1963 wurde erstmals eine pflanzliche QC aus dem Lartex der *Carica papaya* (Papayabaum) isoliert.<sup>[243]</sup> Die erste Säugetier-QC wurde 1987 aus dem Extrakt von Rinderhypophysen isoliert.<sup>[239]</sup> Die pflanzliche und die tierische QC sind beides monomere Glykoproteine mit ähnlichem Molekulargewicht, wie beispielsweise 33 kDa der *Carica papaya* QC (*pQC*) und 40 kDa der humane QC (*hQC*).<sup>[244-246]</sup> Die pflanzlichen als auch die tierischen QCs katalysieren alle die gleiche Reaktion. Dennoch zeigt sich anhand ihrer Aminosäuresequenz und dreidimensionalen Struktur (Abbildung 15), dass sie nicht miteinander verwandt sind.<sup>[242, 247-250]</sup>

Die Peptidkette der *pQC* ist in eine fünf-blättrige  $\beta$ -Faltblatt-Propellerdomäne und zwei kurze  $\alpha$ -Helices gefaltet (Abbildung 15A). Innerhalb des aktiven Zentrums besitzt die *pQC* ein Calcium-Ion.<sup>[242, 247, 249-250]</sup> Die *hQC* weist hingegen eine für bakterielle Aminopeptidasen charakteristische  $\alpha/\beta$ -globale Domäne mit zentralem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt auf (Abbildung 15B).<sup>[242, 248, 251-252]</sup>



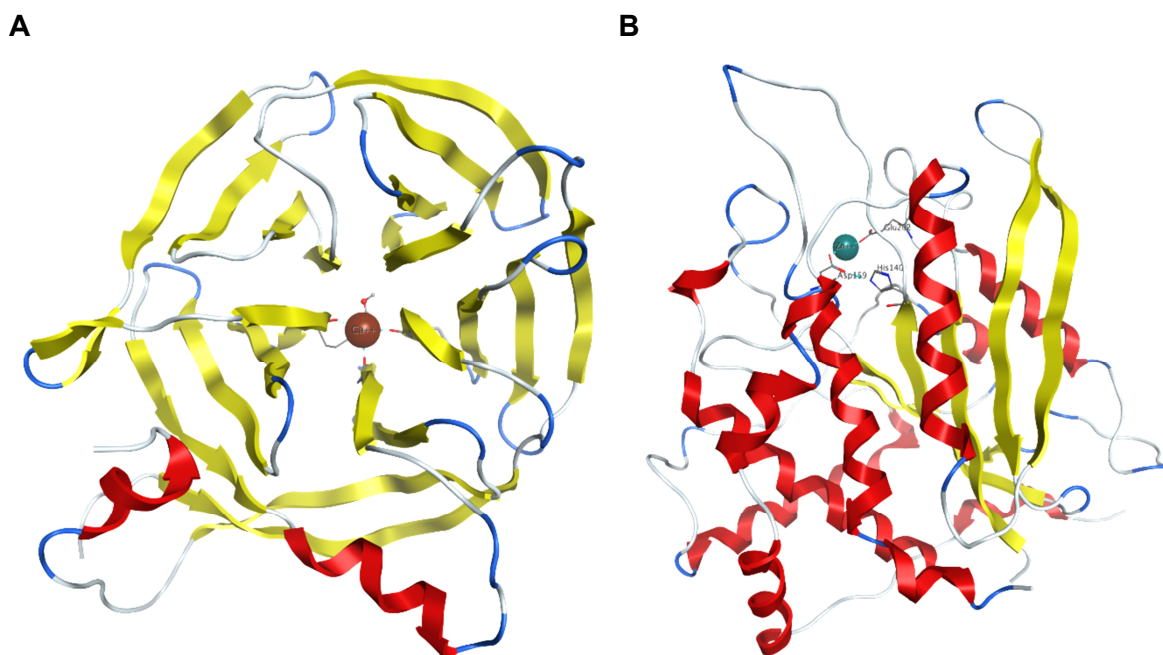
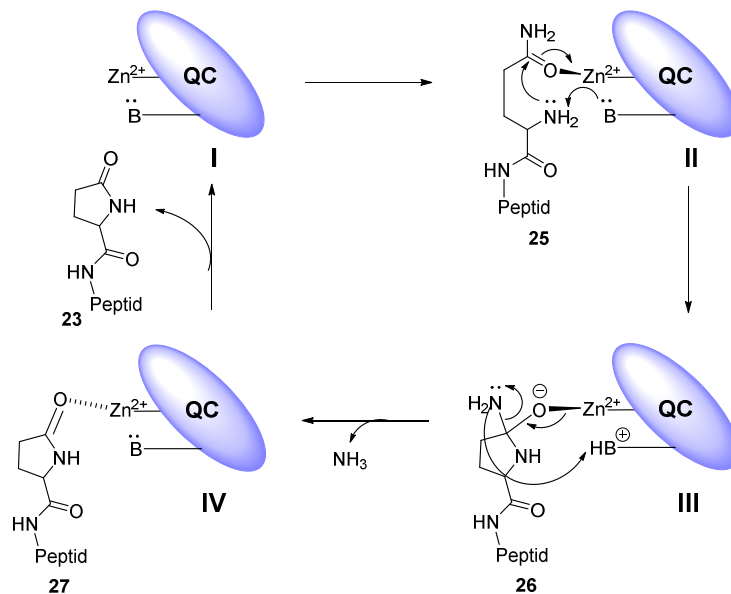


Abbildung 15: Tertiärstruktur der Glutaminyl Cyclasen. (A) *Carica papaya* QC (PDB Code 2IWA). (B) Humane QC (PDB Code 2AFM). Verwendete Software: MOE 2014.0901.

Neben der Struktur weisen auch konservierte Aminosäuren innerhalb des katalytisch aktiven Zentrums auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung zwischen bakteriellen Aminopeptidasen der M28 Familie (Clan MH) und *h*QCs hin. Innerhalb des aktiven Zentrums der Peptidasen werden zwei Zink-Ionen ( $\text{Zn}^{2+}$ ) durch die Aminosäuren His-Asp-Glu-Asp-His komplexiert. Während des evolutionären Wandel zur QC kam es zu dem Verlust einer Zinkbindestelle. Innerhalb des aktiven Zentrums der *h*QC wird nur ein Zink-Ion durch die drei Aminosäuren Asp-Glu-His koordiniert. [242, 248, 251, 253-254]

Der katalytische Mechanismus der Pyroglutamat Bildung ist noch nicht genau aufgeklärt. Es wird vermutet, dass das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion die  $\gamma$ -Carbonylgruppe polarisiert, um den nukleophilen Angriff der  $\alpha$ -Aminogruppe zu ermöglichen (Schema 2 II). Durch den nukleophilen Angriff an der  $\gamma$ -Carbonylgruppe entsteht das Oxyanion **26**, welches durch das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion stabilisiert wird. Anschließend wird gleichzeitig der Lactamring gebildet und ein Proton von der Aminogruppe über die QC-Aminosäure Glu auf die Abgangsgruppe übertragen. Diese wird zum Schluss zusammen mit dem Pyroglutamat **23** freigesetzt. [242, 254]





Schema 2: Schematischer Mechanismus der Zyklisierung von N-terminalem Glutamin durch die *hQC*. Das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion polarisiert die  $\gamma$ -Carbonylgruppe. Nach dem nukleophilen Angriff durch die  $\alpha$ -Aminogruppe und der Übertragung eines Protons auf das katalytisch aktive Glutamin (B), kommt es zum Ringschluss. Anschließend wird das Proton auf die Abgangsgruppe übertragen und diese abgespalten. Das Pyroglutamat ist gebildet und kann freigesetzt werden. Die QC ist für einen neuen katalytischen Zyklus regeneriert. In Anlehnung an Schilling *et al.*<sup>[242]</sup>

#### 1.4.2 Vorkommen und physiologische Funktion der humanen QC

Die QC wird ubiquitär in Pflanzen und Tieren exprimiert. Im Menschen wird die *hQC* gewebespezifisch unterschiedlich stark exprimiert. Hauptsächlich wird die *hQC* im Gehirn und in sekretorischen Drüsen gefunden.<sup>[244, 255-256]</sup> Die zelluläre Lokalisation im endoplasmatischen Reticulum, im Golgi-Apparat und in sekretorischen Vesikeln zeigt, dass die *hQC* an der Synthese und Sekretion von verschiedenen bioaktiven Peptiden beteiligt ist.<sup>[257]</sup> N-terminale Pyroglutamat-Reste werden häufig bei der Bildung und Reifung von regulativen Peptiden oder Proteinen posttranslational gebildet.<sup>[244, 255, 257]</sup> pGlu-Peptide besitzen unterschiedliche Funktionen und sind an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt. Zu den pGlu-Peptiden gehören verschiedene Hormone, Neuropeptide, Chemokine oder Proteine der extrazellulären Matrix. Einige wichtige Beispiele für pGlu-Peptide sind in Tabelle 11 dargestellt.<sup>[242]</sup>

Tabelle 11: Ausgewählte humane pGlu-Peptide und ihre Funktion.<sup>[242]</sup>

Peptid	N-terminale Sequenz	Funktion
Thyreoliberin (TRH)	pGlu-His-Pro...	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hypophysäre Sekretion von Prolaktin und TSH</li> <li>▪ Neurotransmitter/-modulator</li> </ul>
Gonadoliberin (GnRH)	pGlu-His-Trp-Ser...	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hypophysäre Sekretion der Gonadotropine LH und FSH</li> </ul>
Gastrin 17	pGlu-Gyl-Pro-Trp-Leu...	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Stimuliert die HCl-Freisetzung im Magen</li> <li>▪ Stimuliert die glatte Muskulatur im Magen</li> <li>▪ Involviert in Dickdarmkrebs</li> </ul>
Fibronectin	pGlu-Ala-Gln-Gln-Met...	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Zelladhesionsprotein</li> <li>▪ Involviert in die Wundheilung</li> </ul>

Je nach Peptid ist die N-terminale pGlu-Gruppe für die Funktion oder für die Stabilität essentiell. Für das pGlu-Peptide Thyreoliberin (*Thyreotropin releasing hormon*, TRH) wurde gezeigt, dass die N-terminalen pGlu-Gruppe für die Bindung am spezifischen Rezeptor und somit für die biologischen Wirksamkeit essentiell ist.<sup>[242, 258]</sup> Bei Gonadoliberin (*Gonadotropin releasing hormon*, GnRH) hingegen hat die N-terminale pGlu-Gruppe keinen Einfluss auf dessen Aktivität. Für GnRH ist der pGlu-Rest entscheidend für dessen Stabilität im Plasma. Aufgrund des Lactamrings am N-Terminus sind pGlu-Peptide gegenüber den proteolytischen Abbau durch Aminopeptidasen geschützt.<sup>[242, 259]</sup>

Die hQC ist somit nicht nur an der Synthese von regulativen Peptiden beteiligt sondern auch an der Regulation des Peptidabbaus. Folglich wird die hQC mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen in Verbindung gebracht.

### 1.4.3 Die humane Glutaminyl-Cyclase als therapeutisches Target der AD

Die amyloiden Plaques sind eines der beiden Hauptmerkmale der AD. Es wurde gezeigt, dass sie je nach Analysenmethode 10-25% pGlu-modifizierte A $\beta$ -Peptide enthalten.<sup>[260-264]</sup> Die Bildung von pGlu-A $\beta$ -Peptiden (pGluA $\beta$ ) erfolgt über zwei Stufen (Abbildung 16). Zunächst werden die ersten beiden N-terminalen Aminosäuren, Asp1 und Ala2, durch einen unbekannten Mechanismus abgespalten. Als mögliche proteolytisch aktive Enzyme werden hierbei entweder die Aminopeptidase A und durchaus auch BACE diskutiert.<sup>[261, 265-266]</sup> Durch den Abbau der beiden Aminosäuren wird Glu3 frei zugänglich. Die anschließende Zyklisierung des freien Glu3 zum Pyroglutamat wird durch die hQC katalysiert.<sup>[261, 267]</sup>

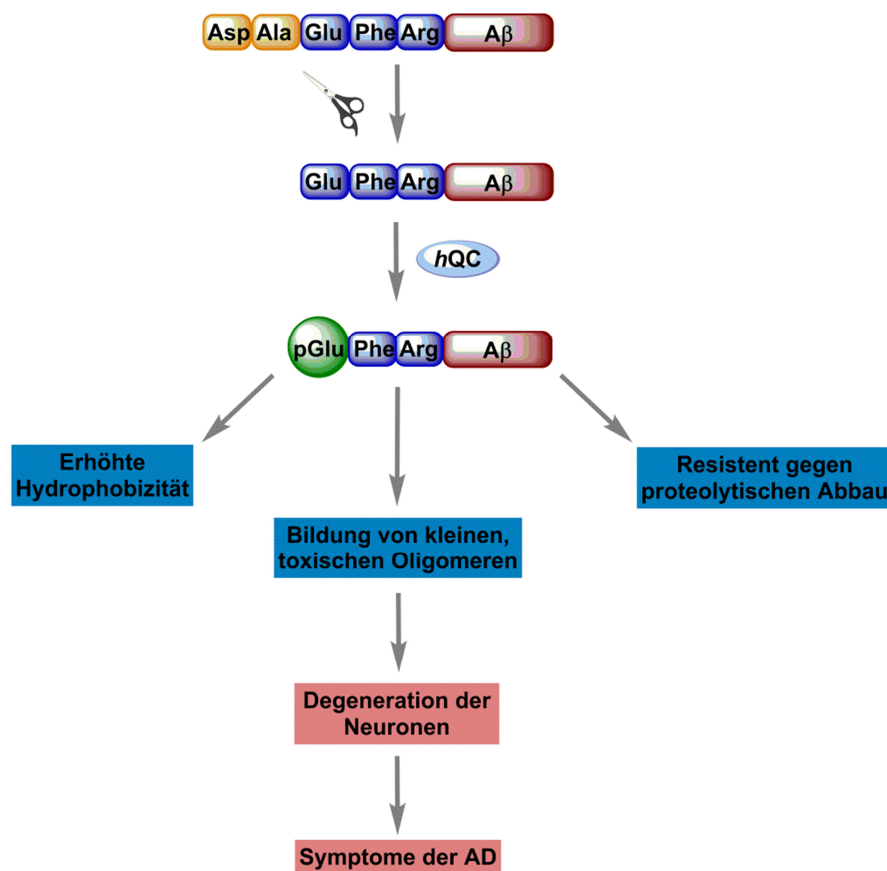


Abbildung 16: Bildung von pGlu-modifizierten A $\beta$ -Peptiden. Durch die Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren Asp1 und Ala2 wird Glu3 frei zugänglich. Somit kann Glu3 durch die hQC zum N-terminalen pGlu modifiziert werden. Das pGluA $\beta$  besitzt veränderte Eigenschaften mit schwerwiegenden pathologischen Konsequenzen. In Anlehnung an *Jawhar et al.*<sup>[261]</sup>

Die pGluA $\beta$ -Peptide besitzen im Vergleich zu A $\beta_{40/42}$  eine erhöhte Hydrophobizität und somit eine gesteigerte Unlöslichkeit. Durch die N-terminale pGlu-Gruppe sind sie außerdem stabil gegenüber dem Abbau durch Aminopeptidasen. Beide Faktoren resultieren in einer vermehrten und beschleunigten Aggregation der pGluA $\beta$ -

Peptide.<sup>[261]</sup> Außerdem wurde von Wulff *et al.* gezeigt, dass pGluA $\beta$ -Peptide bevorzugt kleine, neurotoxische Oligomere bilden.<sup>[264]</sup> Die pGluA $\beta$ -Oligomere können in Anwesenheit von Tau mit A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptiden kooligomerisieren. Die gebildeten Kooligomere weisen im Vergleich zu reinen Oligomeren aus A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptiden eine sehr stark erhöhte Neurotoxizität auf. Die erforderliche Anwesenheit von Tau weist wiederum auf eine Verbindung beider Pathologien der AD hin.<sup>[256, 268]</sup>

Der direkte Zusammenhang zwischen der hQC und der Bildung von pGluA $\beta$ -Peptiden sowie den neuropathologischen Folgen auf das Gedächtnis konnte *in vivo* an hQC-transgenen und *-knockout* Mäusen gezeigt werden.<sup>[256, 269-270]</sup> Demzufolge ist die hQC ein vielversprechendes therapeutisches *Target* für die AD. Das Potential von hQC-Inhibitoren zur Behandlung der AD konnte in AD Mausmodellen bestätigt werden. So konnte mit hQC-Inhibitoren die Menge an pGluA $\beta$ -Peptiden in den Gehirnen von transgenen AD-Mäusen verringert und ein positiver Effekt auf die Lern- und Gedächtnisleistung der Mäuse nachgewiesen werden.<sup>[256, 271-272]</sup>

## 1.5 Das Ubiquitin/Proteasom System

Alle Proteine in einem lebenden Organismus befinden sich in einem komplexen und dynamischen Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau. Der bedeutendste nicht-lysosomale Abbauweg in Pro- und Eukaryonten ist der ATP-abhängige Abbau durch das Ubiquitin/Proteasom-System (UPS).<sup>[273-274]</sup>

### 1.5.1 Die Ubiquitinylierung von Proteinen

Mithilfe der Polyubiquitinylierung werden überflüssig gewordene Proteine für den Abbau durch das UPS markiert. Die Ubiquitinylierung dient aber auch als wichtiges Signal innerhalb der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur, der Apoptose und der Immunantwort.<sup>[273-274]</sup>

Ubiquitin (Ub) ist mit einer Masse von 8 kDa aus 76 Aminosäuren aufgebaut. Über den C-Terminus kann das Ub isopeptidisch auf Lysinseitenketten anderer Proteine übertragen werden. Dies erfolgt über eine Kaskade aus drei enzymatisch katalysierten Reaktionen (Abbildung 17).<sup>[273, 275]</sup>

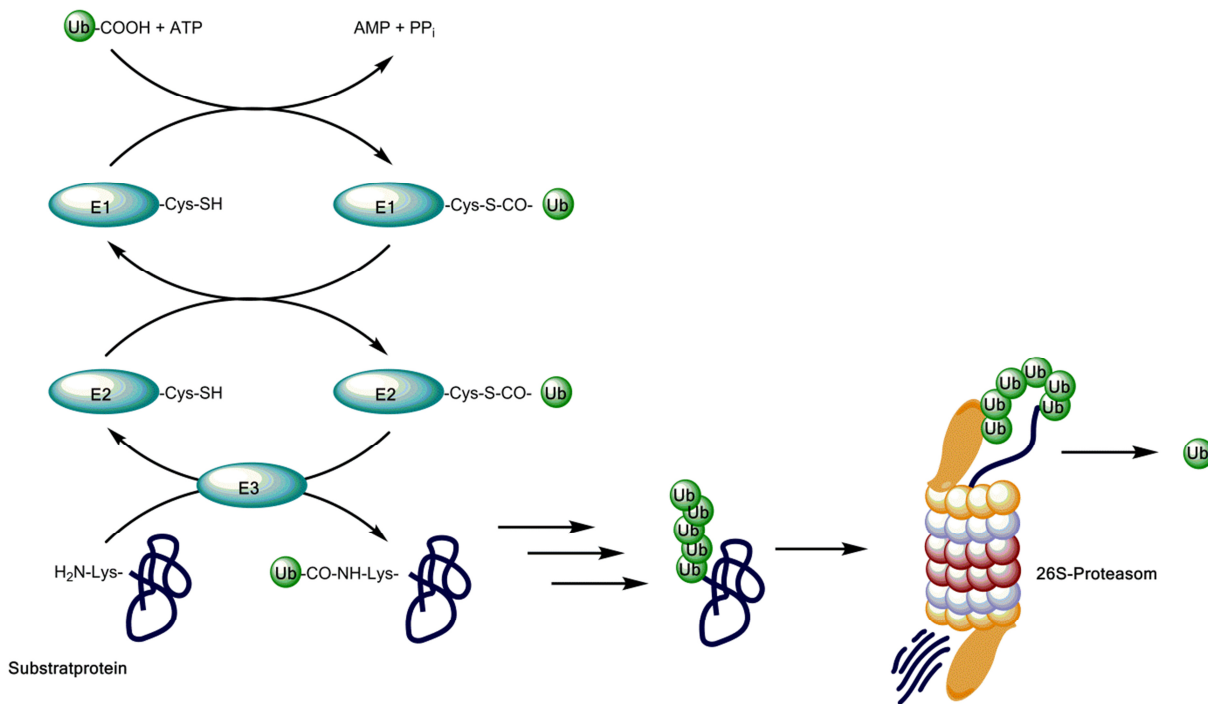


Abbildung 17: Schematische Darstellung des ATP-abhängigen Mechanismus der Polyubiquitinylierung eines Substratproteins mittels der E1/E2/E3-Enzymkaskade. Durch die Ubiquitinylierung wird das entsprechende Protein für den Abbau durch das 26S-Proteasom gekennzeichnet. In Anlehnung an *Biel et al.*<sup>[273]</sup>

Im ersten Schritt der Enzymkaskade wird ein C-terminaler Glycin-Rest des Ubs von dem Ub-aktivierenden Enzym E1 adenyliert und bindet anschließend das aktivierte Ub über eine Thioesterbindung an ein internes E1-Cystein. Im zweiten Schritt wird das Ub auf das Ub-konjugierende Enzym E2 mittels einer Umesterung übertragen. Im letzten Schritt erfolgt die finale Übertragung des Ubs, über eine für das jeweilige Substratprotein spezifische Ub-Ligase E3, auf eine Lysinseitenkette des Zielproteins. Diese Enzymkaskade kann sich mehrmals wiederholen, da das Ub selbst über interne Lysin-Reste, wie beispielsweise Lys48 oder Lys63, verfügt. Somit können viele Ub-Einheiten hintereinander an das Substratprotein gebunden werden. Erfolgt dabei die Polyubiquitinylierung des Proteins über Lys48 verknüpfte Ub-Einheiten, so dient die resultierende Ub-Kette als Kennzeichnung für den Abbau durch das 26S-Proteasom.<sup>[273]</sup>

### 1.5.2 Der proteasomale Abbau von Proteinen

Das 26S-Proteasom ist ein 2.4 MDa großer multifunktionaler, ATP-abhängiger Enzymkomplex, der für den proteolytischen Abbau der meisten Proteine verantwortlich ist. Es besteht aus einem katalytisch-aktiven 20S-Kernkomplex (*core particle*, CP), welcher von zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten (*regulatory particles*, RPs) umgeben ist (Abbildung 18). Die RPs erkennen und binden die polyubiquitinylierten Substratproteine und leiten diese nach dem Entfernen der Ub-Kette und Entfaltung ihrer Struktur weiter an das katalytisch-aktive 20S-Proteasom.<sup>[273, 276-278]</sup>

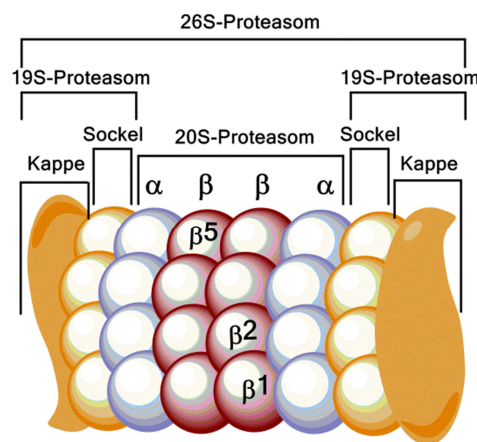
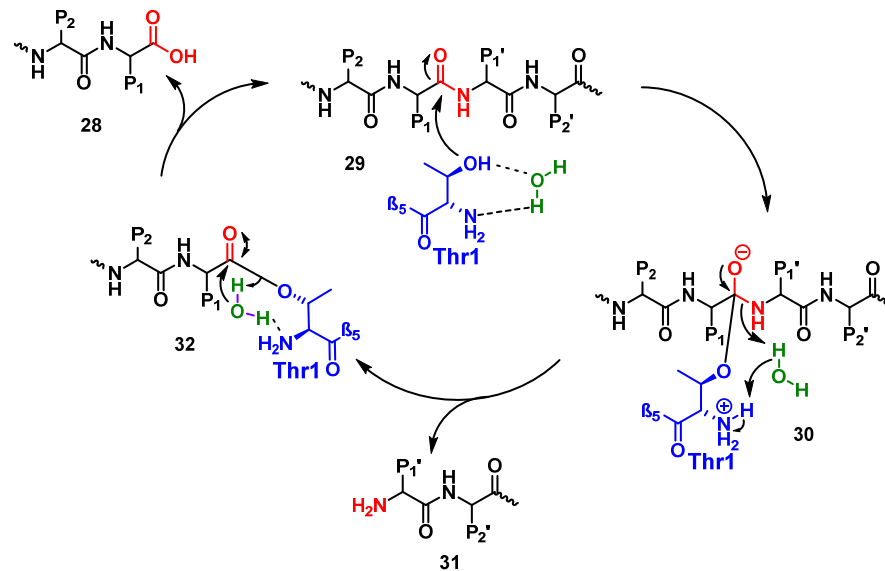


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Struktur des 26S-Proteasoms. In Anlehnung an Voss.<sup>[279]</sup>

Das 20S-Proteasom ist mit einer Masse von ungefähr 700 kDa eine der größten Proteasen. Der CP ist zylindrisch mit einer Länge von  $\sim 160$  Å und einem Durchmesser von  $\sim 120$  Å aus 28 Untereinheiten aufgebaut.<sup>[278, 280]</sup> Die 28 Untereinheiten sind zu 4 Ringen (2  $\alpha$ - und 2  $\beta$ -Ringe) aus je 7 Untereinheiten angeordnet. Diese sind wiederum in einer  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Stöchiometrie aufeinander gestapelt, woraus sich eine 72-Punktsymmetrie ergibt.<sup>[278]</sup> Innerhalb jedes  $\beta$ -Rings liegen je drei katalytisch aktive Taschen ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_5$ ) mit unterschiedlichen Substratpräferenzen. Die Substratspezifität der aktiven Untereinheiten hängt von der Gestalt der Substratbindetaschen des aktiven Zentrums ab. Diese befinden sich innerhalb des Substratbindekanals und unterscheiden sich in Größe und Polarität ihrer Oberfläche.<sup>[278, 281-282]</sup> Für eine einfache Nomenklatur wird das aktive Zentrum als Schnittstelle definiert und davon ausgehend wird der Bindekanal bzw. die peptidische Substratkette in Richtung des N-Terminus als nicht-gestrichene Seite und in Richtung des C-Terminus als gestrichene Seite bezeichnet (Abbildung 19). Die Kavitäten auf der



Intermediat **32** überführt wird. Durch die Hydrolyse des entstandenen Acylester-Intermediats **32** wird das nächste Spaltprodukt **28** freigesetzt und Thr1 für den nächsten Katalysezyklus regeneriert.<sup>[276]</sup> Bei den Spaltprodukten **28** und **31** handelt es sich um Oligopeptide mit einer Kettenlänge von 3 bis 25 Aminosäuren, wobei die Durchschnittslänge 7 bis 8 Aminosäuren beträgt.<sup>[273, 285]</sup>



Schema 3: Mechanismus der proteolytischen Peptidspaltung durch das Proteasom. Das katalytisch aktive Thr1 (blau) greift die zu schneidende Peptidbindung (rot) des Substratproteins nukleophil an. Nach Formierung des Esterintermediats **32** wird das katalytische Thr1 durch Hydrolyse regeneriert und die Spaltprodukte **28** und **31** freigesetzt. In Anlehnung an Kisselev und Goldberg.<sup>[276]</sup>

Die dabei erzeugten Oligopeptide werden teilweise durch Peptidasen weiter gespalten und können so dem Organismus als freie Aminosäuren für die Proteinbiosynthese wieder zur Verfügung stehen. Fragmente mit Kettenlängen zwischen 8 und 9 Aminosäuren werden hingegen häufig nicht weiter gespalten, da sie als T-Zell-Antigene in MHC-Klasse-I-Komplexen (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) dienen können. Hierfür werden vor allem Oligopeptide mit einem basischen oder hydrophoben C-Terminus, folglich Spaltprodukte der  $\beta 2$ - und  $\beta 5$ -Untereinheit, bevorzugt.<sup>[286]</sup>



### 1.5.3 Das Proteasom als therapeutisches Target in der Onkologie

Das UPS ist an einer Vielzahl an zellulären Prozessen, wie dem Zellzyklus, der Apoptose oder der zellulären Stressantwort, entscheidend beteiligt.<sup>[273]</sup> Das UPS hat direkten Einfluss auf das Überleben einer Zelle mit stressinduzierter DNA-Schädigung und steht daher im direkten Zusammenhang mit der Tumorentwicklung und dem Tumorwachstum. Vor allem die zellulären Signalwege des Tumorsuppressorproteins p53 werden diesbezüglich mit dem UPS in Verbindung gebracht.<sup>[273]</sup>

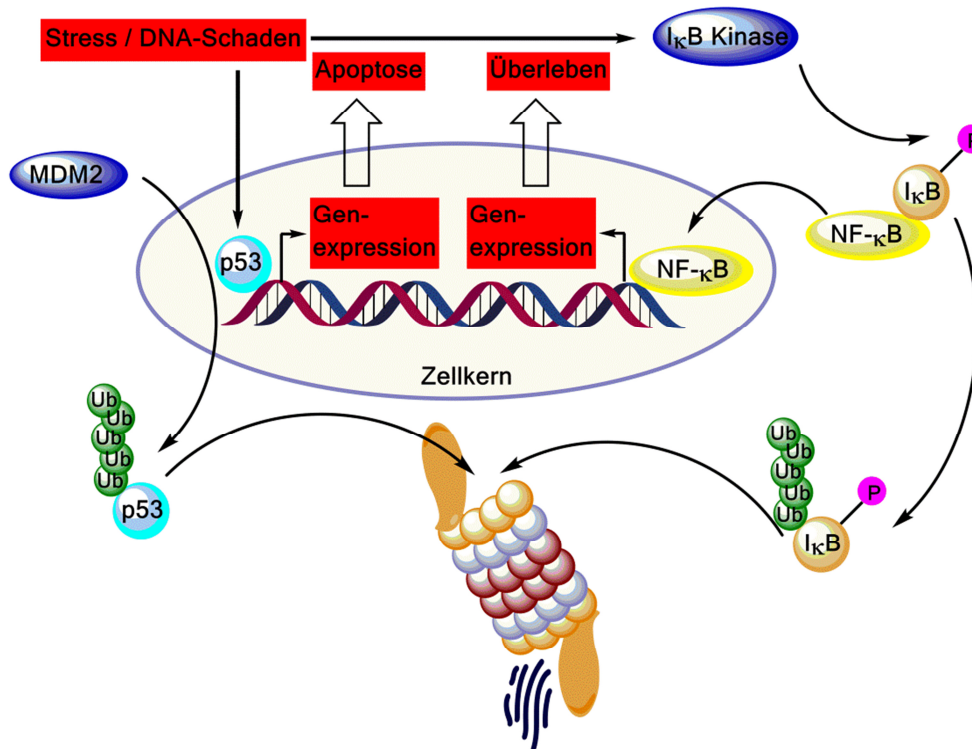


Abbildung 20: Zelluläre Signalwege, die mit dem UPS verknüpft sind, haben Einfluss auf das Überleben einer Zelle mit stressinduzierter DNA-Schädigung. Stressinduzierte DNA-Schäden führen in gesunden Zellen zur Akkumulation des Tumorsuppressors p53, wodurch die Apoptose der Zelle eingeleitet wird. Durch Polyubiquitynylierung von p53 und anschließendem proteasomalen Abbau wird dies verhindert und die DNA-geschädigte Zelle überlebt. Durch den proteasomalen Abbau von I $\kappa$ B wandert NF- $\kappa$ B in den Nukleus und verstärkt dort die Expression von Zielgenen, die das Überleben der DNA-geschädigten Zelle ermöglichen. In Anlehnung an Biel et al.<sup>[273]</sup>

Zellulärer Stress, wie z.B. reaktive Sauerstoff- oder Stickstoff-Spezies, Zytokine, Viren oder ionisierende Strahlung, verursacht DNA-Schäden innerhalb der Zelle. In gesunden Zellen werden daraufhin Tumorsuppressorproteine, wie p53 oder p27, exprimiert, welche den Zellzyklus stoppen, damit der Schaden durch intrazelluläre Reparaturmechanismen behoben werden kann. Ist die Reparatur der DNA nicht möglich, wird p53 überexprimiert. Dies führt zur Akkumulation von p53 und nach aktivierter Genexpression schließlich zur Apoptose der geschädigten Zelle (Abbildung 20). p53 verhindert somit die Teilung von Zellen mit geschädigter DNA. Die

---

Inaktivierung von p53 ist ein universeller Schritt in der Entartung von gesunden Zellen zu malignen Tumoren.<sup>[287]</sup> In Tumorzellen wird durch Polyubiquitinylierung von p53 durch die Ub-Ligase MDM2 und anschließenden proteasomalen Abbau die p53-Akkumulation verhindert, wodurch es zum unkontrolliertem Zellwachstum kommt.<sup>[273]</sup>

Zellulärer Stress führt auch zur Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B-Inhibitors (I $\kappa$ B). Dies führt zur Polyubiquitinylierung von I $\kappa$ B und dessen Abbau durch das Proteasom. Dadurch wird wiederum NF- $\kappa$ B freigesetzt und wandert in den Zellkern. Durch die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus wird die Expression bestimmter Zielgene verstärkt. Dabei werden vor allem Zielgene exprimiert, welche für die Regulierung verschiedener Signalwege, die das Überleben der Zelle sichern, verantwortlich sind. Letztendlich kann dies zum Überleben der DNA-geschädigten Zelle führen.<sup>[273]</sup> Aufgrund der einflussreichen Position des Proteasoms innerhalb der p53- und NF- $\kappa$ B-Signalwege sind Proteasom Inhibitoren ein vielversprechender Ansatz in der Tumorthherapie von soliden Tumoren und der AML.<sup>[273, 278, 288]</sup>

---

## 2 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

---

### Isoform-selektive Inhibition der GSK-3

Die derzeitige Standardbehandlung der AML mit einer Chemotherapie ist nicht nur sehr aggressiv sondern für die Mehrheit der Patienten auch ineffektiv. Zielgerichtete Therapieansätze sind daher äußerst erstrebenswert. Jüngst wurde die  $\alpha$ -Isoform der GSK-3 als mögliches *Target* der AML identifiziert. Obwohl eine Vielzahl an potenten GSK-3-Inhibitoren bekannt ist, unterscheidet keiner effektiv zwischen den beiden Isoformen. Der Hauptfokus dieser Dissertation liegt daher in der Entwicklung, Synthese und Evaluation isoform-selektiver GSK-3-Inhibitoren. Ausgehend von dem im Arbeitskreis *Schmidt* entwickelten  $\alpha$ -selektiven GSK-3-Inhibitor **BSc4676 (33)** (Abbildung 21) gilt es eine Serie an möglichen weiteren Inhibitoren mittels *in silico* Design zu konzipieren. Dabei soll die Struktur von **BSc4676 (33)** zu besser löslichen Verbindungen modifiziert werden und gleichzeitig die  $\alpha$ -Selektivität erhalten bleiben. Die vielversprechendsten Strukturkandidaten sollen synthetisiert und anschließend *in vitro* auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  getestet werden. Bislang konnte die Tertiär-Struktur der GSK-3 $\alpha$  noch nicht aufgeklärt werden. Anhand eines Homologiemodells der GSK-3 $\alpha$  und den Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der isoform-selektiven Verbindungen sollen die strukturellen Unterschiede der beiden Isoformen sowie die Ursachen der  $\alpha$ -Selektivität der Inhibitoren abgeleitet werden. Die Wirkung der GSK-3-Inhibitoren kann am Zebrafisch-Embryo nachgewiesen werden. Um die Effektivität am lebenden Organismus sowie die Toxizität der Inhibitoren zu bewerten, sollen die effektivsten Inhibitoren am Zebrafisch-Embryo getestet werden. Zum Schluss sollen die besten Inhibitoren im Bezug auf ihre  $\alpha$ -Selektivität sowie Wirkung in AML-modifizierten Zellen evaluiert werden. Mithilfe der  $\alpha$ -selektiven Inhibitoren soll das therapeutische Potential der GSK-3 $\alpha$  für die Behandlung der AML verifiziert werden.

Im Anschluss soll in einem weiteren Projekt ein neuer struktureller Ausgangspunkt für die Inhibition der GSK-3 gefunden werden. Dazu sollen zuerst von bekannten Kinase-Inhibitoren bevorzugte Molekulgrundgerüste identifiziert und darauf aufbauend neue Leitstrukturen für potentielle GSK-3-Inhibitoren konzipiert werden.

## Dual-selektive Inhibition der GSK-3 und *h*QC

Gegenwärtig können bei der Behandlung der AD nur die Symptome gelindert, die Krankheit jedoch nicht geheilt werden. Neue Therapieansätze für die AD werden dringend gesucht. Die molekularen Grundlagen und Prozesse, welche die AD auslösen sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Hyperphosphoryliertes Tau und pGlu-modifizierte A $\beta$ -Peptide stehen derzeit als mögliche Verursacher der AD stark im Fokus der Forschung. Ziel dieses Projektes war es mit einem dual-selektiven Inhibitor zum einen die GSK-3, welche für die Hyperphosphorylierung von Tau verantwortlich gemacht wird, und zum anderen die *h*QC, welche die Zyklisierung des freien Glu3 von A $\beta$ -Peptiden zum Pyroglutamat katalysiert, gleichzeitig zu hemmen.

## Tivantinib als potentieller GSK-3-Inhibitor

Die Firma *ArQule* entwickelte **Tivantinib (115, ARQ197)** (Abbildung 54) ursprünglich als potenten und selektiven c-Met Inhibitor. In verschiedenen klinischen Studien zeigte **Tivantinib (115)** sehr gute Antitumor-Wirkungen. Neue Beobachtungen legen jedoch nahe, dass die Antitumor-Eigenschaft von **Tivantinib (115)** nicht durch die Hemmung von c-Met begründet sein kann. 2014 identifizierte die Arbeitsgruppe *Rix et al.* die GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  als neue *Targets* von **Tivantinib (115)** mit einer Selektivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$ . Demzufolge wäre **Tivantinib (115)** der erste  $\alpha$ -selektive GSK-3-Inhibitor innerhalb klinischer Prüfung. Folglich soll in dieser Arbeit **Tivantinib (115)** auf seine inhibitorische Aktivität gegenüber GSK-3 $\alpha/\beta$  sowie c-Met untersucht werden.

## Liganden-Erkennung der katalytischen $\beta$ 5-Untereinheit des 20S-Proteasoms

Das letzte Teilprojekt dieser Arbeit stellt die Inhibition des 20S-Proteasoms dar. Die Inhibition der katalytischen  $\beta$ 5-Untereinheit des 20S-Proteasoms ist ein anerkannter Ansatz für die Behandlung von hämatologischen Krebserkrankungen. Basierend auf dieser Thematik soll mittels mechanistischer Studien untersucht werden, inwiefern die enzymatische Aktivität der  $\beta$ 5-Untereinheit von der Konformationsänderung von Met45 und dem Ligand abhängt.

---

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Im folgenden Kapitel werden die erzielten Ergebnisse dargestellt. Die Arbeit gliedert sich in mehrere Teilprojekte, wobei der Fokus auf der Entwicklung von isoform-spezifischen, besser löslichen, ATP-kompetitiven GSK-3-Inhibitoren liegt. Innerhalb der einzelnen Projekte werden folgende Arbeitsschritte näher beschrieben: Das computergestützte Design neuer Zielstrukturen, die retrosynthetische Betrachtung der Zielstrukturen, die Synthesen der Zielstrukturen sowie die abschließende Evaluation der biologischen Aktivität der Zielstrukturen.

#### 3.1 Oxadiazol-Derivate als $\alpha$ -selektive GSK-3-Inhibitoren für eine zielgerichtete Therapie der akuten myeloischen Leukämie

Inhalte dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht.<sup>[205]</sup>

**Autoren:** Theresa Neumann, Lina Benajiba, Stefan Göring, Kimberly Stegmaier, Boris Schmidt.

**Titel:** Evaluation of Improved Glycogen Synthase Kinase-3 $\alpha$  Inhibitors in Models of Acute Myeloid Leukemia.

**Journal:** *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58 (22), 8907-8919.

**DOI:** 10.1021/acs.jmedchem.5b01200.

Mit freundlicher Genehmigung von *ACS Publications* [RightsLink® by Copyright Clearance Center].

#### Zusammenfassung

Die Herausforderung bei der Entwicklung von GSK-3-Inhibitoren liegt in dem Bestreben eine hohe Selektivität für eine Isoform gegenüber der Andere zu erreichen. Zielgerichtete Therapieansätze bestimmter Krankheiten, wie beispielsweise der AML, verlangen eine spezifische Inhibition der  $\alpha$ -Isoform.

In der Arbeitsgruppe *Schmidt* wurde der GSK-3-Inhibitor **BSc4676 (33)** mit der bis dato höchsten GSK-3 $\alpha$  Selektivität entwickelt (Abbildung 21).<sup>[289]</sup> Für den Nachweis der Wirksamkeit im lebenden Organismus mangelt es **BSc4676 (33)** jedoch an einer ausreichenden Wasser-Löslichkeit. Ausgehend von **BSc4676 (33)** wurde mittels rationalem Design eine Reihe verbesserter GSK-3-Inhibitoren entwickelt. Unter 15

---

neuen Verbindungen zeigte **BSc5090 (36)** im Vergleich zu **BSc4676 (33)** eine höhere Aktivität gegenüber beiden Isoformen sowie eine gesteigerte  $\alpha$ -Selektivität. Von den Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der isoform-selektiven Verbindungen sowie dem erstellten Homologiemodell der GSK-3 $\beta$  und der alignierten Aminosäuresequenz der GSK-3 $\alpha$  wurde die Annahme abgeleitet, dass die Isoform-Selektivität der Inhibitoren aufgrund der beiden unterschiedlichen Aminosäuren, Arg148 (GSK-3 $\beta$ ) und Lys211 (GSK-3 $\alpha$ ), innerhalb der Arg-reichen Schleife hervorgerufen wird.

Ermöglicht durch die erhöhte Wasser-Löslichkeit konnte **BSc5090 (36)** auf seine *in vivo* Wirksamkeit und Toxizität in einem Phänotyp-basierten Zebrafischembryonen-Assay getestet werden. Dabei konnte der charakteristische Phänotyp ohne Letalität nachgewiesen werden.

Die selektive GSK-3 $\alpha$  Hemmung durch **BSc5090 (36)** konnte in zwei AML-Zelllinien nachgewiesen werden. Dies führte zu einem stark konzentrationsabhängigen Differenzierungsphänotyp der Zellen sowie zur Verminderung der Koloniebildung. Dies zeigt, dass die zuvor entarteten AML-Zellen durch **BSc5090 (36)** in unterschiedliche gesunde Blutzellen differenzieren. Die beobachtete Wirkung der  $\alpha$ -selektiven Inhibition auf die AML-Zelllinien bestätigt die GSK-3 $\alpha$  als therapeutisches *Target* der AML.

**BSc5090 (36)** ist somit nicht nur *in vitro* und *in vivo* aktiv, vielmehr zeigt es auch eine vielversprechende Wirkung im Krankheitsmodell. Infolgedessen wird dem  $\alpha$ -selektiven Inhibitor **BSc5090 (36)** ein großes Potential für die Behandlung der AML zugeschrieben.

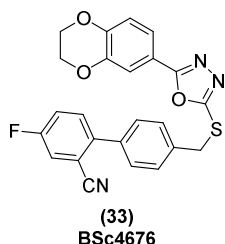
Beitrag T. Neumann: Projektplanung, Entwurf neuer Strukturkandidaten, Protein/Liganden-Docking, Synthesen aller Verbindungen, Analyse der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, Erstellung des Homologiemodells, Bestimmung der wässrigen Löslichkeit, *In vivo* Evaluation am Zebrafisch Embryo, Verfassen des Manuskriptes.

In den folgenden Unterkapiteln werden die bereits veröffentlichten sowie die noch unveröffentlichten Ergebnisse dieses Projektes im Detail beschrieben.

### 3.1.1 Einleitung und Motivation

Motiviert durch den ATP-kompetitiven GSK-3 $\beta$  Inhibitor **AR-A014418 (13)** von *AstraZeneca* und dessen Kokristallstruktur (PDB Code 1Q5K) wurde im Arbeitskreis *Schmidt* eine Reihe von ATP-kompetitiven GSK-3-Inhibitoren entwickelt. Aus den Vorarbeiten von *Lo Monte* und *Kramer* stammt eine Vielzahl an Oxadiazol-Derivaten, welche hoch potente Inhibitoren der GSK-3 sind.<sup>[289]</sup> Die entwickelten Oxadiazol-Derivate zeichnen sich nicht nur durch ihre hohe Aktivität sondern auch durch eine hohe Selektivität gegenüber der GSK-3 $\alpha/\beta$  im Vergleich zu anderen Kinasen sowie besonders durch eine beeindruckend hohe GSK-3 $\alpha$ -Selektivität aus. Bis dato konnte mit noch keinem bekannten GSK-3-Inhibitor eine so deutliche Diskriminierung der beiden Isoformen erreicht werden.

**BSc4676 (33)** zählt zu den aktivsten und selektivsten GSK-3-Inhibitoren dieser Reihe (Abbildung 21). **BSc4676 (33)** weist einen IC<sub>50</sub> von 2 nM für die GSK-3 $\alpha$  und 185 nM für die GSK-3 $\beta$  auf und ist somit 92.5-fach selektiver für die GSK-3 $\alpha$  als die GSK-3 $\beta$ .



IC<sub>50</sub>(GSK-3 $\alpha$ ) = 2 nM  
IC<sub>50</sub>(GSK-3 $\beta$ ) = 185 nM

Abbildung 21: **BSc4676 (33)**: GSK-3-Inhibitor mit der höchsten Aktivität und  $\alpha$ -Selektivität aus der Reihe der Oxadiazol-Derivate von *Lo Monte* und *Kramer*.<sup>[289]</sup>

Allerdings konnte die *in vivo* Effektivität von **BSc4676 (33)** aufgrund der schlechten Wasser-Löslichkeit nicht untersucht werden. Vor allem wegen der schlechten physikochemischen Eigenschaften von **BSc4676 (33)** wird außerdem von einer mangelnden Zellgängigkeit sowie mangelnder Penetration der Blut-Hirn-Schranke ausgegangen. Beide Faktoren sind jedoch Voraussetzung für eine mögliche Anwendung des Inhibitors in der Therapie der AD und AML.

Da die Tertiär-Struktur der GSK-3 $\alpha$  bisher kristallographisch noch nicht aufgeklärt wurde, sind die strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Isoformen noch nicht vollständig bekannt. Die Zusammenhänge zwischen der  $\alpha$ -Selektivität und der Struktur der Oxadiazol-Derivate konnten somit noch nicht erklärt werden.

### 3.1.2 *In silico* Design neuer $\alpha$ -selektiver GSK-3-Inhibitoren basierend auf BSc4676

BSc4676 (33) diente als Leitstruktur für die Entwicklung neuer verbesserter GSK-3-Inhibitoren. Mithilfe von *in silico* Methoden wurden Derivatisierungsmöglichkeiten von BSc4676 (33) analysiert und neue Zielstrukturen ermittelt.

Aus Vorarbeiten von *Lo Monte* und *Kramer* ging hervor, dass die Kopfgruppe, welche die Dihydrobenzdioxin- und die Oxadiazol-Gruppe umfasst, zu einer hohen inhibitorischen Aktivität gegenüber den Isoformen der GSK-3 führt. Folglich haben alle neu entworfenen Strukturen diese Kopfgruppe gemeinsam.

Für die schlechte Wasser-Löslichkeit von BSc4676 (33) wird vor allem die biphenylische Endgruppe verantwortlich gemacht. Die Gründe für die  $\alpha$ -Selektivität der Oxadiazol-Derivate sind noch nicht verstanden, was vor allem durch die fehlende Tertiär-Struktur der GSK-3 $\alpha$  begründet ist. Dennoch wird vermutet, dass das Substitutionsmuster der biphenylischen Endgruppe für die  $\alpha$ -Selektivität entscheidend ist. Durch die systematische Modifikation des inneren Phenyl-Rings (Abbildung 22A, rot) sowie des äußeren Phenyl-Rings (Abbildung 22A, blau) der Endgruppe sollte daher zum Einen die Wasser-Löslichkeit verbessert und zum Anderen die strukturellen Zusammenhänge zwischen  $\alpha$ -Selektivität und Derivatisierung aufgeklärt werden.

Dementsprechend wurden 140 neue Strukturen entwickelt, welche sich durch unterschiedliche Substitutionsmuster des äußeren Rings sowie durch Heteroatome innerhalb beider Ringe unterscheiden. Mithilfe des molekularen Dockings wurden anschließend die vielversprechendsten Strukturkandidaten ausgewählt.

Die GSK-3 $\alpha$  und die GSK-3 $\beta$  besitzen innerhalb der ATP-Bindungstasche eine Sequenzhomologie von 98%. Die Tertiär-Struktur der GSK-3 $\beta$  ist bereits seit 2001 bekannt und wurde für die *in silico* Untersuchungen herangezogen. Zahlreiche Röntgenkristallstrukturen der GSK-3 $\beta$  mit und ohne kokristallisiertem Inhibitor sind veröffentlicht. In den durchgeführten Docking-Studien wurde aufgrund des übereinstimmenden Oxadiazol-Rings die Kokristallstruktur der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88) mit einem Oxadiazol-Inhibitors verwendet.

Um potentielle Inhibitor-Kandidaten gegenüber der Leitstruktur BSc4676 (33) beurteilen zu können, wurden zunächst die essentiellen Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen von BSc4676 (33) mit dem aktiven Zentrum der GSK-3 $\beta$  ermittelt. Sämtliche folgende Docking-Arbeiten wurden mithilfe der Software *Molecular Operating Environment (MOE) 2014.0901*<sup>[290]</sup> ausgeführt (siehe Abschnitt 5.1 ).



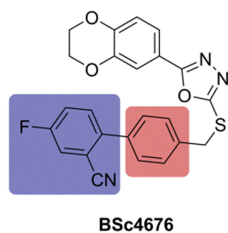
Das Docking von **BSc4676 (33)** in die ATP-Tasche der GSK-3 $\beta$  wurde mit dem *Amber12:EHT* Kraftfeld<sup>[291-292]</sup> durchgeführt. Aufgrund der Parametrisierung durch *Amber* für Proteine und durch die *2D Extended Hückel Theory (EHT)* für kleine Moleküle eignet sich das Kraftfeld sehr gut sowohl für Proteine als auch für kleine Liganden.<sup>[291-292]</sup> Die generierten Posen wurden durch die MOE-interne Scoring-Funktion *London dG* bewertet. Die empirische Scoring-Funktion besteht aus der Summe von fünf berechneten Energieanteilen:

- Änderungen der Rotations- und Translationsentropie ( $c$ ),
- Energieänderung durch Verlust von Flexibilität ( $E_{\text{Flex}}$ ),
- Energiebeiträge basierend auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken ( $E_{\text{H-Bond}}$ ),
- Beiträge aus Metallkomplexierungen ( $E_{\text{M-Lig}}$ ),
- Energieänderungen aus der Desolvatisierung von Atomen ( $D_{\text{Atom}}$ ).<sup>[290]</sup>

Im Vergleich zu empirischen Scoring-Funktionen, wie der *London dG* Funktion, liefern wissensbasierte Scoring Funktionen meistens realitätsnähere Bindungsgeometrien. Daher wurden die zuvor erhaltenen Posen erneut mit der wissensbasierten *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion<sup>[293]</sup> (*Drug Score Extended, DSX* und *Cambridge Structure Database, CSD*) bewertet, um daraus die Pose mit der wahrscheinlichsten Konformation zu identifizieren. Die wissensbasierte *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion wird aus der Summe der Distanz-abhängigen, der Torsionswinkel-abhängigen und der Desolvations-abhängigen Paarpotentiale berechnet. Bei dem Distanz-abhängigen Paarpotential werden typische Abstände zwischen interagierenden Protein- und Ligandatomen und bei dem Torsionswinkel-abhängigen Paarpotential werden typische Diederwinkel der Bindungen im Liganden bewertet. Beide Paarpotentiale werden aus den Strukturen der *CSD*-Datenbank berechnet. Für das Desolvations-abhängige Paarpotential werden Desolvationseffekte aufgrund der Ligandenbindung berücksichtigt, welche von bekannten Protein-Liganden-Komplexen der *PDB*-Datenbank (*Protein Data Bank, PDB*) abgeleitet werden.<sup>[293]</sup>

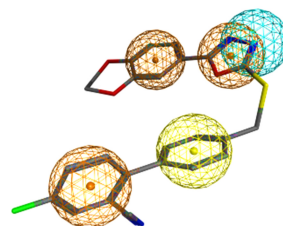
Die aus dem *DSX<sup>CSD</sup>*-Scoring resultierende beste Konformation von **BSc4676 (33)** ist in Abbildung 22A/B dargestellt und stimmt mit den von der Arbeitsgruppe *Schmidt* bereits publizierten Docking-Ergebnissen überein.<sup>[289]</sup>

A

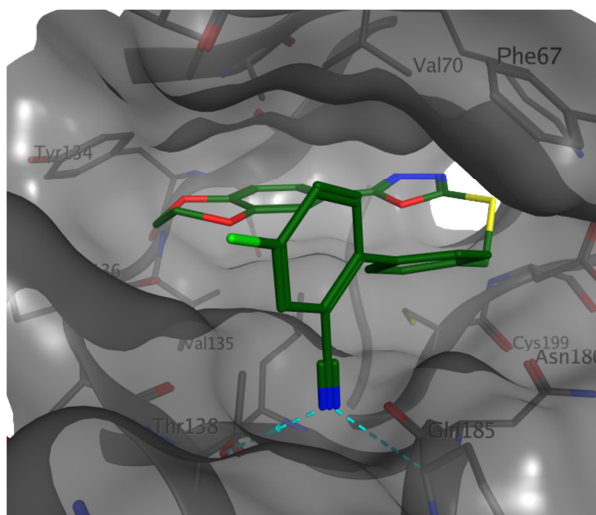


BSc4676

B



C



D

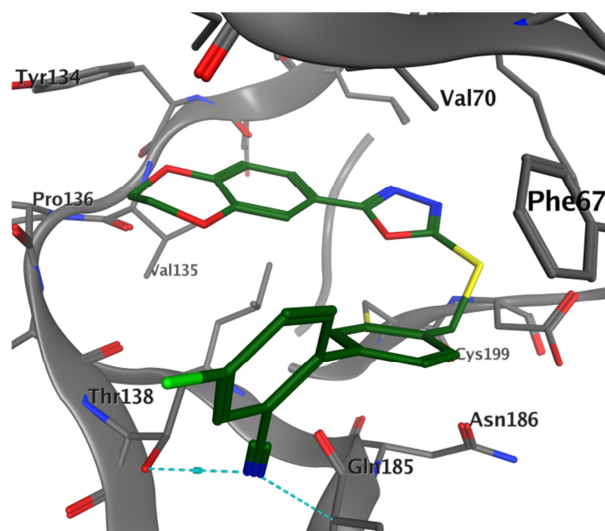


Abbildung 22: (A) Systematische Veränderungen der Leitstruktur **BSc4676 (33)** für mögliche Derivatisierungen. (B) Pharmakophormodell basierend auf den Docking-Ergebnissen aus (C/D). Das Pharmakophormodell wird dargestellt durch aromatische Ringe (orange Kugeln), einem hydrophoben Zentrum (gelbe Kugel) und einem Wasserstoffbrücken-Akzeptor (blaue Kugel). (C) und (D) durch Protein/Liganden-Docking resultierende Bindungsgeometrie von **BSc4676 (33)** in der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88). Verwendete Software: *MOE 2014.0901*. Bild in (B) und (D) Kopie aus *Neumann et al., J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8907.<sup>[205]</sup> Mit freundlicher Genehmigung von *ACS Publications* [RightsLink® by Copyright Clearance Center].

Die Kopfgruppe von **BSc4676 (33)**, welche die Dihydrobenzdioxin- und die Oxadiazol-Gruppe umfasst, ist in Richtung der *Hinge* Region gerichtet und bildet eine hydrophobe Wechselwirkung mit Tyr134 aus (Abbildung 22C, D). Der Oxadiazol-Ring liegt zwischen den Aminosäuren Val70 und Cys199. Die biphenylische Endgruppe baut eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit Phe67 und eine H- $\pi$ -Wechselwirkung mit Gln185 auf. Zusätzlich bildet der Nitril-Substituent eine Wasserstoffbrücke mit Thr138.

Für das Docking der neu entworfenen Strukturen wurde ausgehend von dem erhaltenen Bindungsmodus von **BSc4676 (33)** ein liganden-basiertes Pharmakophormodell erstellt. Das Pharmakophormodell weist drei aromatische Deskriptoren auf, welche durch den Oxadiazol-Ring und zwei Phenyl-Ringe ausgefüllt werden (Abbildung 22C, orange Kugeln). Ein weiterer Deskriptor ist ein hydrophobes Zentrum, welches durch den inneren Phenyl-Ring der biphenylischen Endgruppe

dargestellt wird (Abbildung 22C, gelbe Kugel). Der letzte Deskriptor ist ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor, welcher durch ein Stickstoffatom innerhalb des Oxadiazol-Rings gebildet wird (Abbildung 22C, blaue Kugel).

Mit der Intention die erfolgversprechendsten Derivatisierungsmöglichkeiten von **BSc4676 (33)** zu identifizieren, wurde ein Pharmakophor-basiertes Docking der zuvor designten Liganden in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  durchgeführt. Insgesamt wurden 140 Strukturen gescreent. Für jede Struktur wurden 1000 Konformationen erstellt und mithilfe des Pharmakophormodells in die ATP-Bindungstasche platziert. Anschließend wurden mit der *London dG* Funktion die 30 besten Konformationen ausgewählt. Wie bereits erwähnt liefern empirische Scoring-Funktionen meistens nicht die plausibelste Bindungsgeometrie des Liganden. Häufig ist dies durch die nicht-planare Abbildung von aromatischen Ringen zu erkennen (Abbildung 23A, rote Liganden). Daher sollte aus den generierten 30 besten Konformationen anschließend die Konformation, welche dem real gebundenen Zustand am besten entspricht, gefunden werden. Die erhaltenen Posen wurden nochmals durch die *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion bewertet. Die von der *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion am besten bewerteten Docking-Posen stimmten mit der Orientierung der Leitstruktur **BSc4676 (33)** innerhalb der ATP-Tasche überein (Abbildung 23B).

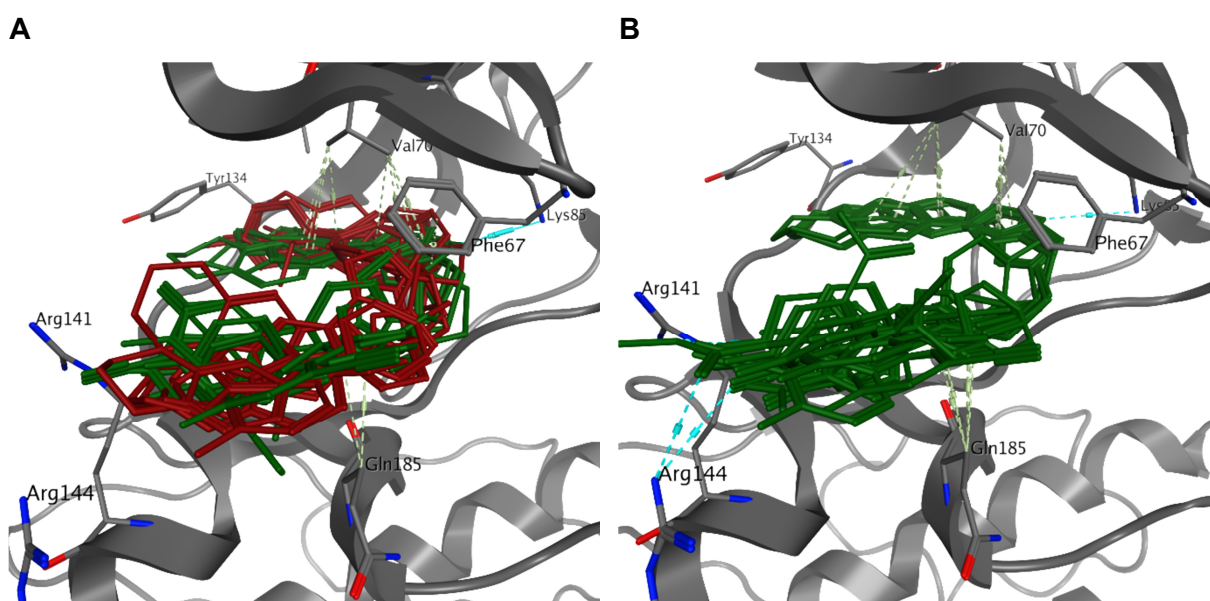


Abbildung 23: (A) Durch die *London dG* Scoring-Funktion am besten bewerteten Konformationen des Pharmakophor-basierten Dockings der zuvor designten Liganden in die ATP-Tasche der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88). Unwahrscheinliche Konformationen sind rot und wahrscheinliche Konformationen sind grün gefärbt. (B) Realitätsnahe Bindungsgeometrien der Liganden beurteilt durch die wissensbasierte *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion. Verwendete Software: *MOE 2014.0901*.

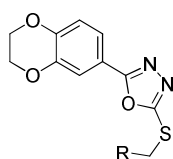
Bei der Analyse der *DSX*-Scoring Werte (*DSX*-Score) fällt auf, dass vor allem große Liganden durch ihr hohes Molekulargewicht bessere Werte aufweisen. Für die Beurteilung der Verbindungen wurde daher die von der Molekülgröße bereinigte Liganden-Effizienz (LE) herangezogen. Die LE ist gleich dem Quotienten aus *DSX*-Score und der Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome ( $a_{heavy}$ ).

$$LE = \frac{DSX-Score}{a_{heavy}} \quad (I)$$

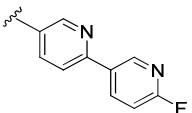
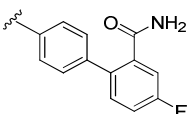
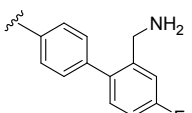
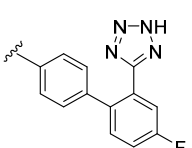
Im nächsten Schritt wurden die Strukturkandidaten mit der besten LE weiter nach ihren ClogP-Werten beurteilt. Hierbei sollte herausgefunden werden, welche Verbindungen polarer und somit vermutlich besser wasser-löslich als **BSc4676 (33)** sind. Deshalb wurden alle Strukturen mit einem ClogP-Wert  $\geq 4.5$  verworfen. Eine Ausnahme stellte dabei Verbindung **34b** dar (Tabelle 12). Mithilfe von **34b** sollten Kenntnisse über strukturelle Gründe der  $\alpha$ -Selektivität der Oxadiazol-Derivate gewonnen werden. Durch den ClogP- Filter reduzierte sich die Anzahl potentieller Strukturkandidaten auf 94.

Im letzten Schritt wurden die Strukturen bezüglich ihrer chemischen Zugänglichkeit, wie beispielsweise Verfügbarkeit gewünschter Edukte oder Machbarkeit der geplanten Syntheseroute, analysiert. Daraus gingen schließlich 13 vielversprechende Strukturkandidaten hervor (Tabelle 12), welche im folgenden Verlauf synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität gegenüber GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  evaluiert werden sollten.

Tabelle 12: Übersicht der aussichtsreichsten Derivatisierungsmöglichkeiten von **BSc4676 (33)**. Die Auswahl erfolgte nach DSX-Score, LE, ClogP und chemischer Zugänglichkeit.



Verbindung	R	DSX-Score	Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome ( <i>a_heavy</i> )	Liganden-Effizienz (LE)	ClogP <sup>a</sup>
<b>BSc4676 (33)</b>		-166.83	32	-5.21	4.60
<b>34b</b>		-173.63	30	-5.79	5.17
<b>34c</b>		-161.79	30	-5.39	3.97
<b>34d</b>		-162.96	31	-5.26	3.37
<b>34e</b>		-170.04	30	-5.67	4.24
<b>34f</b>		-167.08	30	-5.57	3.76
<b>34g</b>		-167.41	31	-5.40	3.36
<b>34h</b>		-168.55	30	-5.62	4.03
<b>35a</b>		-166.27	32	-5.20	3.15
<b>35b</b>		-170.78	32	-5.34	3.36

35c		-166.68	30	-5.56	2.55
BSc5090 (36)		-175.60	33	-5.32	3.39
37		-172.48	32	-5.39	3.82
38		-190.55	35	-5.44	4.06

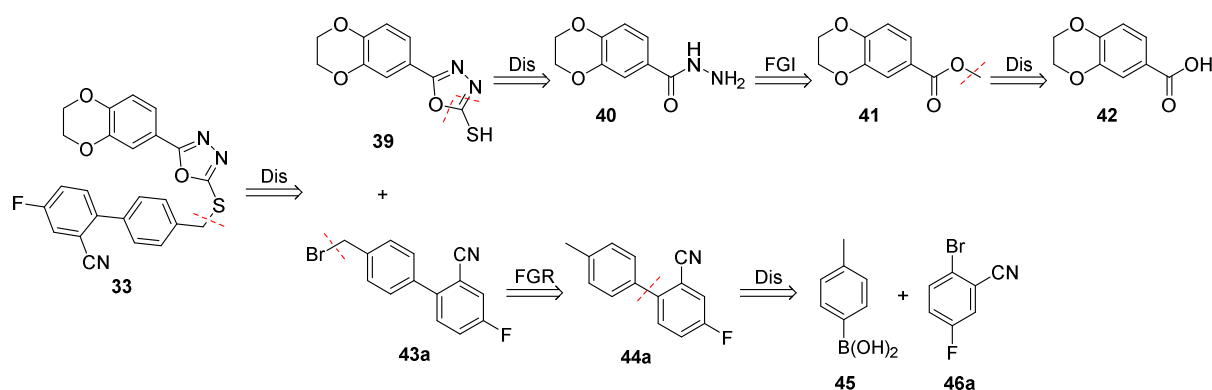
<sup>a</sup> Berechnet mit *ChemBioDraw Ultra* (Version 13.0.2).<sup>[294]</sup>

### 3.1.3 Synthesen der GSK-3-Inhibitoren

Im folgenden Kapitel wird zunächst die retrosynthetische Analyse der Leitstruktur **BSc4676 (33)** beschrieben, da die folgenden Synthesen der gewünschten Zielstrukturen auf dieser aufbauen. Im Anschluss erfolgt die Beschreibung der präparativen Arbeiten, indem die einzelnen Schritte des realisierten Synthesepfades detailliert dargestellt werden. Zum Schluss sind alle synthetisierten Inhibitoren sowie die erhaltenen Ausbeuten und Reinheiten nochmals zusammengefasst.

#### Retrosynthese der Leitstruktur **BSc4676 (33)**

Die Basis der Syntheseroute der neuen GSK-3-Inhibitoren bildete die bereits bekannte Retrosynthese der Leitstruktur **BSc4676 (33)** nach *Lo Monte und Kramer*.<sup>[289]</sup> Als erster retrosynthetischer Schritt führt die Thioetherspaltung von **BSc4676 (33)** zu den zwei separaten Retrosynthesezweigen des Oxadiazolthiol-Bausteins **39** und des biphenylischen Bausteins **43a** (Schema 4).



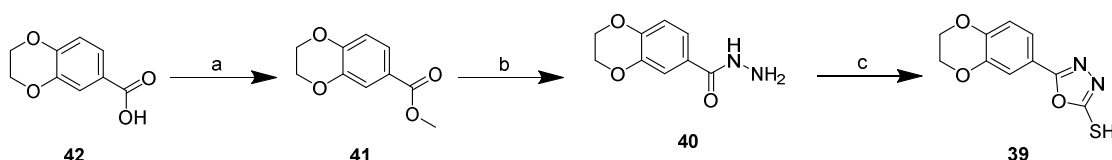
Schema 4: Retrosynthetische Zerlegung der Leitstruktur **BSc4676 (33)** nach *Lo Monte und Kramer*.<sup>[289]</sup>

Die Zerlegung des Oxadiazol-Bausteins **39** beginnt mit der Öffnung des Oxadiazol-Rings zum Carbonsäurehydrazid **40**. Die Umwandlung der Hydrazid-Gruppe von **40** zum Methylester **41** und der anschließenden Ester-Spaltung führt zu der Carbonsäure **42**. Bei dem biphenylischen Baustein **43a** wird zunächst die Brom-Gruppe entfernt und anschließend die beiden Phenyl-Ringe voneinander getrennt. Im Folgenden wird auf die einzelnen Arbeitsschritte genauer eingegangen.

## Synthese des Oxadiazolthiol-Bausteins 39

Alle Inhibitoren haben den gleichen oxadiazolischen Baustein **39** als sogenannte Kopfgruppe. Aufgrund der dadurch benötigten großen Menge an **39** wurde die Synthese mehrmals durchgeführt, weshalb die Ausbeuten in Prozentspannen angegeben sind.

Als Ausgangsstoff für die 3-stufige Synthese diente die kommerziell verfügbare 1,4-Benzodioxan-6-carbonsäure (**42**). Diese wurde in Anwesenheit von Thionylchlorid und MeOH zum Methylester **41** in sehr guten Ausbeuten von 90-99% verestert. Der Methylester **41** wurde mit überschüssigem Hydrazin-Monohydrat in das Hydrazid **40** überführt und ohne weitere Reinigung umgesetzt. In der anschließenden basenkatalysierten Ringbildung mit Kohlenstoffdisulfid wurde der Oxadiazol-Baustein **39** in Ausbeuten von 45-80% erhalten.



Schema 5: Darstellung des Oxadiazol-Bausteins **39**. Reagenzien und Bedingungen: (a)  $\text{SOCl}_2$ , MeOH, 0-50°C, 16 h, 90-99%; (b)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, 75°C, 2 d, Rohprodukt; (c)  $\text{CS}_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , EtOH, 75°C, 2 d, 45-80%.

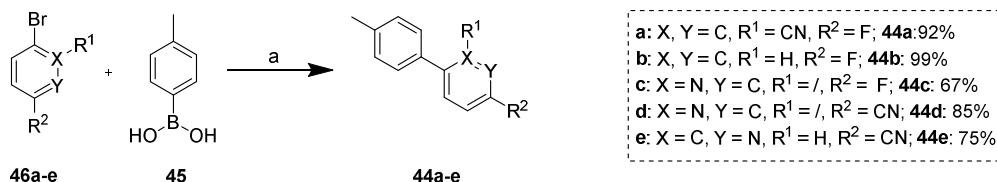
## Synthese der biphenylischen Bausteine

Die synthetisierten GSK-3-Inhibitoren unterscheiden sich innerhalb ihrer biphenylischen Endgruppe. An unterschiedlichen Positionen wurden hierfür Stickstoffatome in die Phenyl-Ringe eingeführt und die Substituenten variiert. Die Synthese erfolgte dennoch für alle nach der gleichen Synthesestrategie über zwei Reaktionsstufen, einer Pd-katalysierten Suzuki-Reaktion<sup>[295-296]</sup> gefolgt von einer Bromierung in benzyli-scher Position.

Trotz unterschiedlichen Edukten konnten alle durchgeführten Suzuki-Reaktionen unter den gleichen Bedingungen mit 0.3 mol% Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) als Katalysator, 2 N Natriumcarbonat-Lösung als Base und einem Lösungsmittelgemisch aus Toluol und Ethanol im Verhältnis 1:1 durchgeführt werden. Die erzielten Produkte und die dazugehörigen Ausbeuten sind den jeweiligen Schemata (Schema 6 und Schema 7) zu entnehmen.

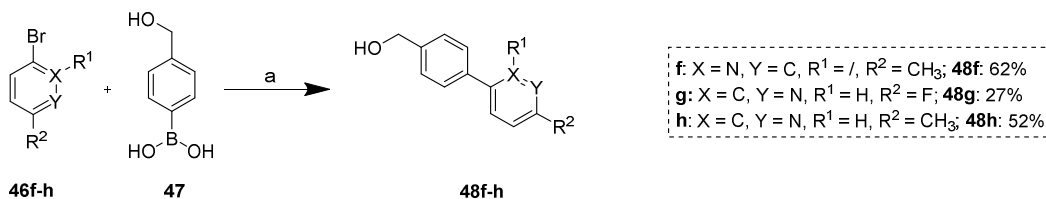


Für die Darstellung der Inhibitoren **34a-e** wurde die *p*-Tolylboronsäure (**45**) mit den entsprechenden Bromiden **46a-e** unter Suzuki-Bedingungen zu den methylierten Biphenyl-Derivaten **44a-e** verknüpft. Die erzielten Ausbeuten variierten dabei zwischen 67% und quantitativen 99%.



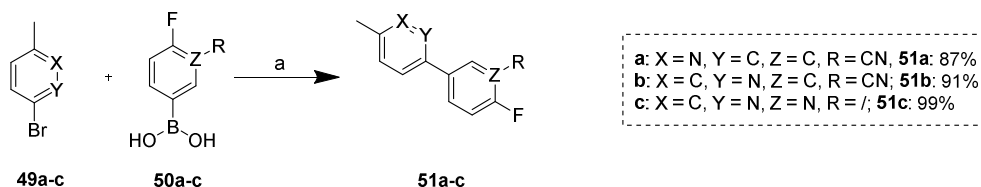
Schema 6: Pd-katalysierte Suzuki-Kupplung. Reagenzien und Bedingungen: (a) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 2 N aq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Toluol/EtOH 1:1, 80°C, 2 d, 67-99%.

Aufgrund des Methyl-Substituenten innerhalb der Zielstrukturen **34f-h** wurde anstelle der *p*-Tolylboronsäure (**45**) die (Hydroxy)-Boronsäure **47** als Kupplungspartner innerhalb der Suzuki-Reaktionen verwendet (Schema 7). Die Bromide **46f-h** wurden mit der (Hydroxy)-Boronsäure **47** zu den gewünschten Biphenyl-Derivaten **48f-h** umgesetzt. Die dabei erlangten Ausbeuten lagen im moderaten Bereich zwischen 27-62%.



Schema 7: Pd-katalysierte Suzuki-Kupplung. Reagenzien und Bedingungen: (a) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 2 N aq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Toluol/EtOH 1:1, 80°C, 2 d, 27-62%.

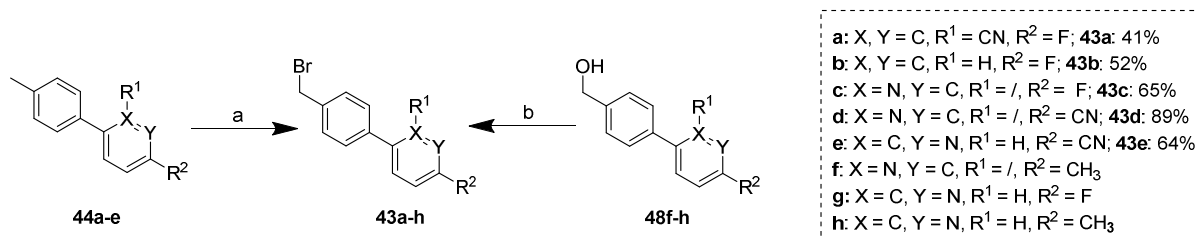
Aufgrund der kommerziellen Zugänglichkeit der erforderlichen Edukte wurde für die Darstellung der Biphenyle **51a-c** die Fluorboronsäuren **50a-c** mit den Bromiden **49a-c** verknüpft (Schema 8). Bei allen drei Reaktionen konnten sehr gute Ausbeuten zwischen 87-99% erzielt werden.



Schema 8: Pd-katalysierte Suzuki-Kupplung. Reagenzien und Bedingungen: (a) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 2 N aq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Toluol/EtOH 1:1, 80°C, 2 d, 87-99%.

Im weiteren Verlauf wurde die Brom-Gruppe an der benzylichen Positionen der Biphenyl-Derivate **44a-e** und **48f-h** eingeführt. Für die Intermediate **44a-e** erfolgte

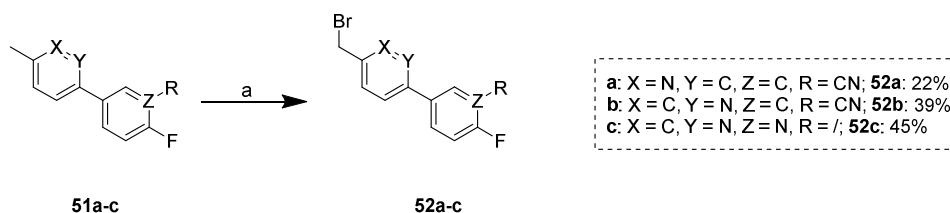
dies mittels radikalischer Bromierung mit dem Bromierungsreagenz NBS und dem Radikalstarter AIBN in Tetrachlorkohlenstoff (Schema 9). In den durchgeführten Reaktionen wurden neben den gewünschten monobromierten Produkten **43a-e** auch geminale Bisbromide als Nebenprodukte gebildet. Daher konnten nach säulenchromatographischer Reinigung die monobromierten Produkte **43a-e** nur in moderaten Ausbeuten von 52-89% erzielt werden.



Schema 9: Bromierung der benzylichen Position: Reagenzien und Bedingungen: (a) NBS, AIBN, CCl<sub>4</sub>, 80°C, 16 h, 52-64%. (b) PBr<sub>3</sub>, Toluol, 110°C, 2 h.

Die Hydroxy-Gruppe der benzylichen Alkohole **48f-h** wurde in Anwesenheit von Phosphortribromid durch Brom substituiert. Die erhaltenen benzylichen Bromide **43f-h** wurden anschließend ohne weitere Reinigung als Rohprodukte umgesetzt.

Die Bromierung der Intermediate **51a-c** erfolgte erneut mittels der radikalischen Bromierung mit NBS. Auch hierbei wurden die Produkte **52a-c** mit sehr niedrigen Ausbeuten von 22-45% erhalten.

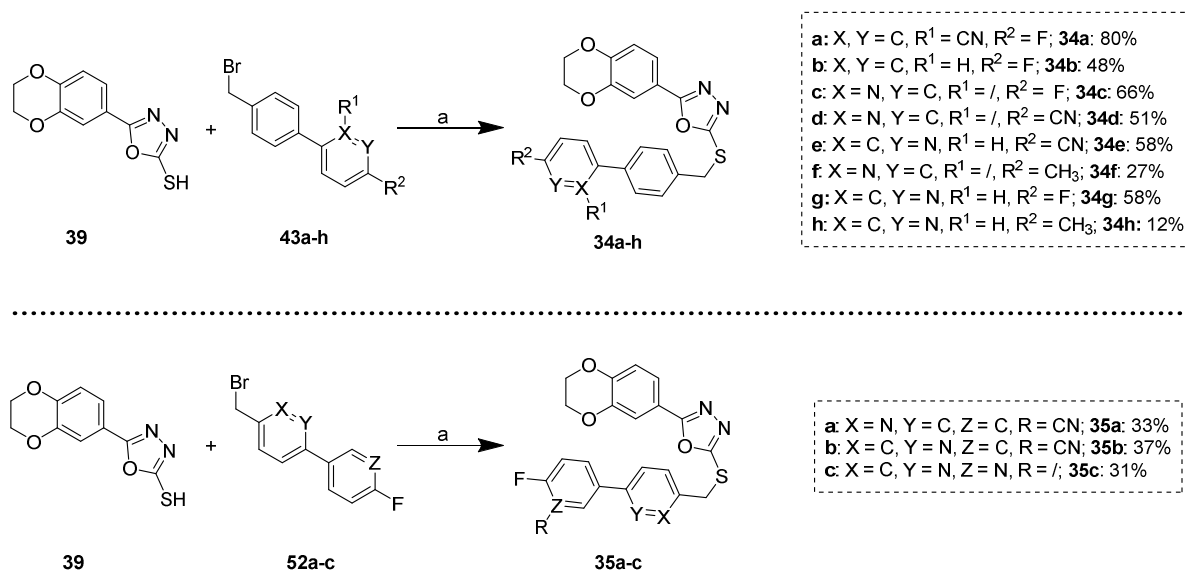


Schema 10: Radikalische Bromierung der benzylichen Position: Reagenzien und Bedingungen: (a) NBS, AIBN, CCl<sub>4</sub>, 80°C, 16 h, 22-45%.

## Verbindung der Bausteine zu den Zielstrukturen

Im letzten Syntheseschritt erfolgte die Verknüpfung des Oxazdiazolthiol-Bausteins **39** mit den monobromierten Biphenyl-Derivaten **43a-h** und **52a-c** in einer nukleophilen Substitution unter stark basischen Bedingungen (Schema 11). Die gewünschten

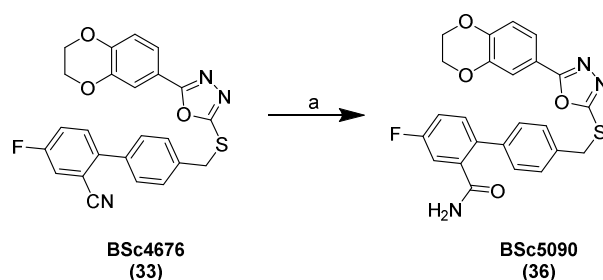
Zielstrukturen **34a-h**, und **35a-c** konnten in unterschiedlichsten Ausbeuten (12-80%) dargestellt werden.



Schema 11: Darstellung der Zielstrukturen: Reagenzien und Bedingungen: (a) 4 N aq NaOH, DMF, RT, 6 h, 12-80%.

## Darstellung des Benylamids **36** (BSc5090)

Für die Synthese der Zielstruktur **BSc5090** (**36**) diente **BSc4676** (**33**) als Ausgangsmaterial. Die Nitril-Gruppe von **BSc4676** (**33**) wurde durch eine partielle Hydrolyse unter Verwendung von konzentrierter Schwefelsäure und Trifluoressigsäure zur Amid-Funktion in **36** umgewandelt (Schema 12). Für die *in vitro* und *in vivo* Evaluation wurde die Synthese von **BSc5090** (**36**) optimiert und weitere analytische Daten erfasst. Dabei konnte die Ausbeute von moderaten 27%<sup>[34]</sup> aus der ersten Synthese auf beachtliche 78% gesteigert werden.



Schema 12: Partielle Hydrolyse von **BSc4676** (**33**) zum Benzylamid **36** (**BSc5090**). Reagenzien und Bedingungen: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, TFA, 70°C, 2 h, 78%.

Die Nitril-Gruppe von **BSc4676 (33)** sollte zum Amin **36** reduziert werden. Hierfür wurden mehrere Experimente mit verschiedenen Hydrierungsreagenzien durchgeführt. In Tabelle 13 sind die verschiedenen Experimente zusammengefasst.

Chemical reaction scheme showing the conversion of BSc4676 (33) to compound 37. BSc4676 (33) is a benzothiazine derivative with a 2-cyano-4-fluorophenyl group. It reacts under conditions 'a-e' to form compound 37, which is a benzothiazine derivative with a 2-amino-4-fluorophenyl group. The reaction is indicated by a crossed-out arrow.

Ansatz	Reagenz (eq)	LM	Temperatur [°C]	Reaktionszeit [h]	Ergebnis
(a)	LiAlH <sub>4</sub> (3.0)	THF	0 bis 70	1	Zersetzung
(b)	LiAlH <sub>4</sub> (3.0)	THF	0 bis RT RT bis 30	48 4	Kein Umsatz, dann Zersetzung
(c)	NaBH <sub>4</sub> (2.5) + TFA (3.0)	THF	0 bis RT	16	Kein Umsatz
(d)	BH <sub>3</sub> • THF (2.0)	THF	0 bis RT RT bis 70	4 44	Kein Umsatz
(e)	BH <sub>3</sub> • THF (4.0)	THF	MW, 100	1	Kein Umsatz

75

Ansatz (c) erfolgte in Anlehnung zur Patentvorschrift US 20100099684 A1<sup>[298]</sup> mit Natriumborhydrid und Trifluoressigsäure in trockenem THF. Bei der Reaktionskontrolle per HPLC konnte kein Umsatz von **BSc4676 (33)** beobachtet werden. Wie ursprünglich erwartet, ist Natriumborhydrid nicht reaktiv genug um die Nitril-Gruppe zu hydrieren.

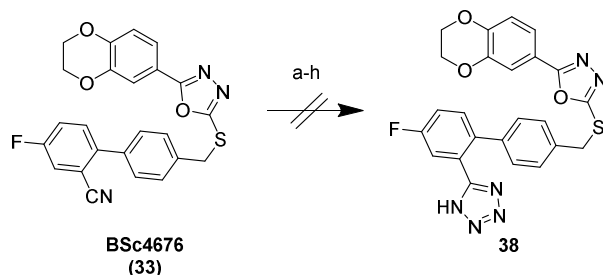
Daher wurde erneut das Hydrierungsreagenz gewechselt. In Ansatz (d) und (e) wurde der Boran-THF-Komplex als Hydrierungsreagenz eingesetzt. Der Boran-THF-Komplex unterscheidet sich von den zuvor verwendeten ionischen Hydrierungsreagenzien in soweit, dass die Hydridübertragung nicht über ein Hydrid-Ion sondern intramolekular über einen Lewis-Säure-Base-Komplex erfolgt. In Anlehnung an *Li et al.*<sup>[299]</sup> wurde bei Ansatz (d) **BSc4676 (33)** in THF gelöst und bei 0°C der Boran-THF-Komplex hinzugegeben. Die Mischung wurde über 4 h langsam auf RT erwärmt und anschließend bei 70°C für 2 d gerührt. Eine Umsetzung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die alternative Durchführung von Ansatz (e) in der Mikrowelle bei 100°C zeigte auch nach 24 h keinen Umsatz.

Es hat sich gezeigt, dass mit den verwendeten Hydrierungsreagenzien bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen **BSc4676 (33)** nicht zu dem gewünschten Amin **37** reduziert werden konnte. Durch eine katalytische Hydrierung mit beispielsweise Palladium auf Aktivkohle hätte das gewünschte Amin **37** eventuell dargestellt werden können. Für die Durchführung einer solchen Hydrierung hätte jedoch eine weitere Menge an **BSc4676 (33)** über 6 Synthesestufen nachgezogen werden müssen. Nach einer Nutzen-Zeit-Analyse wurde allerdings darauf verzichtet **BSc4676 (33)** erneut zu synthetisieren. Folglich wurde eine katalytische Hydrierung von **BSc4676 (33)** nicht getestet.

### Ringschluss zum Tetrazol **38**

Die Nitril-Gruppe von **BSc4676 (33)** sollte mit Natriumazid in einer intermolekularen [2+3]-Cycloaddition zum Tetrazol **38** überführt werden. Hierfür wurden mehrere Ansätze unter verschiedenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. In Tabelle 14 sind die Versuche zusammengefasst.

Tabelle 14: Durchgeführte Experimente zur geplanten Tetrazolsynthese ausgehend von **BSc4676 (33)**.



Ansatz	NaN <sub>3</sub> [eq]	Salz oder Säure (eq)	LM	Temperatur [°C]	Reaktions- zeit [h]	Ergebnis
(a)	1.3	NH <sub>4</sub> Cl (1.3)	DMF	100	48	Kein Umsatz
(b)	12.0	NH <sub>4</sub> Cl (12.0)	DMF	MW, 130	2	Zahlreiche Nebenprodukte oder Zersetzung
(c)	12.0	NH <sub>4</sub> Cl (12.0)	DMF	MW, 100	24	Kein Umsatz
(d)	1.3	Et <sub>3</sub> N • HCl (1.3)	Toluol	100	48	Kein Umsatz
(e)	1.1	ZnBr <sub>2</sub> (1.0)	H <sub>2</sub> O	100	48	Kein Umsatz
(f)	3.0	AcOH (1.0)	[BMIM]Cl	140	16	Kein Umsatz
(g)	3.0	AcOH (1.0)	[BMIM]Cl	MW, 140	0.5	Zersetzung
(h)	3.0	AcOH (1.0)	[BMIM]Cl	MW, 75	72	Kein Umsatz

In Ansatz (a) wurde zunächst die konventionelle Methode der [2+3]-Cycloaddition von Nitrilen und Natriumazid mit Ammoniumchlorid in DMF herangezogen. Normalerweise handelt es sich dabei um eine sehr schnelle Reaktion, welche innerhalb von wenigen Stunden vollendet ist. Bei Ansatz (a) zeigt sich jedoch auch nach 48 h immer noch kein Umsatz von **BSc4676 (33)**, sodass der Ansatz verworfen wurde. Um eine Reaktion dennoch auszulösen wurde in Ansatz (b) die Menge an Natriumazid und Ammoniumchlorid auf jeweils 12 eq erhöht. Außerdem wurde die Reaktion in der Mikrowelle bei 130°C durchgeführt. Ansatz (b) wurde aufgrund des erhöhten Risikos der Bildung von explosivem Ammoniumazid nur mit einer sehr kleinen Ansatzgröße (20 mg von **BSc4676 (33)**) gefahren. Bei der Reaktionskontrolle per HPLC zeigten sich bereits nach 2 h zahllose Peaks. Es wird vermutet, dass entweder zahlreiche Nebenprodukte gebildet wurden oder sich **BSc4676 (33)** zersetzt hat. Dabei kann nicht eindeutig gesagt werden, ob das gewünschte Tetrazol **38** gebildet wurde. Eine Isolierung eines möglichen Produktes war aufgrund der

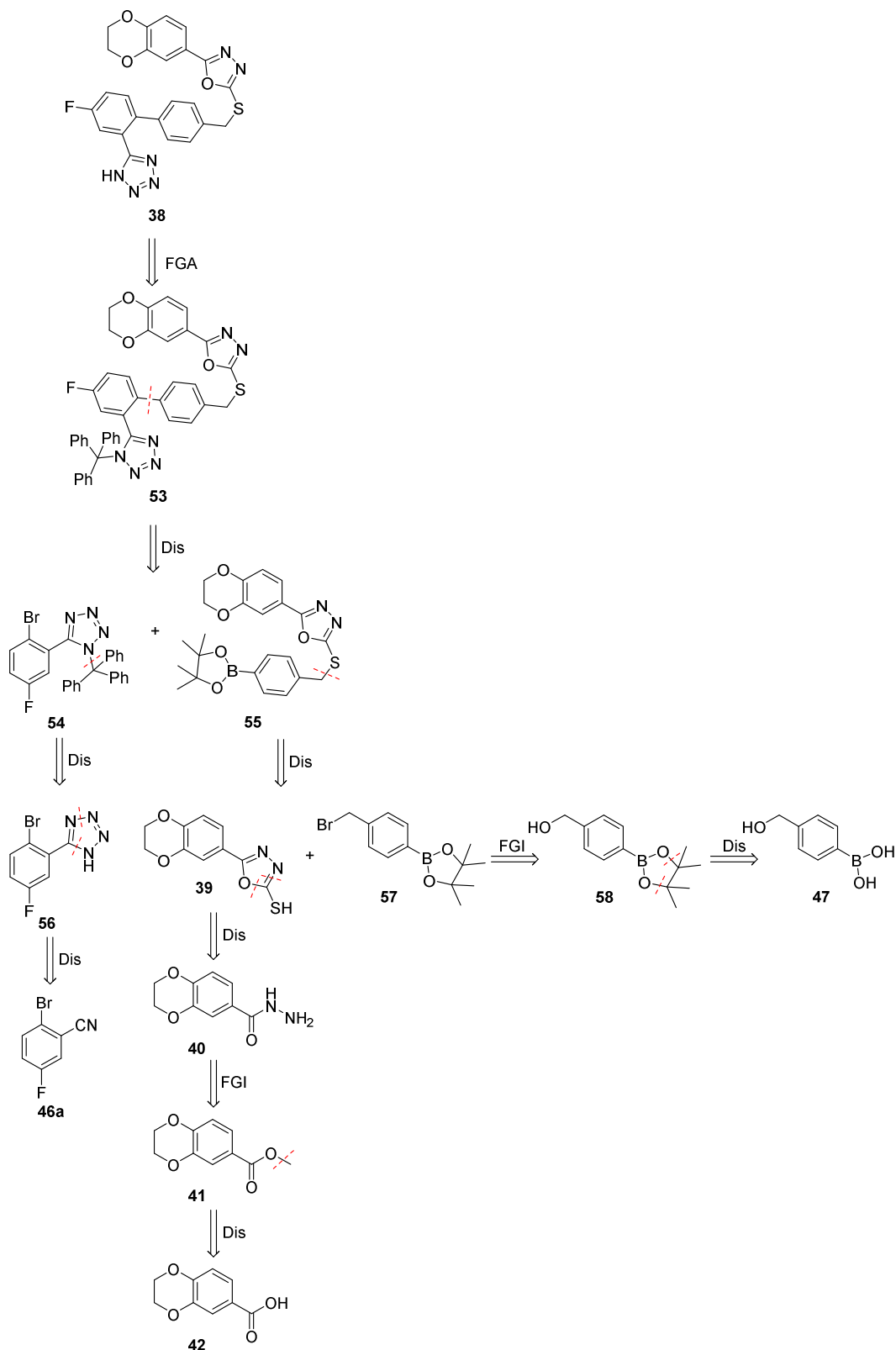
zahlreiche Nebenprodukte und der kleinen Ansatzgröße nicht möglich. Um die Vermutungen zu belegen wurde die Reaktion in Ansatz (c) im größeren Maßstab wiederholt. Um die Bildung von Nebenprodukten zu reduzieren wurde die Reaktion bei einer niedrigeren Temperatur von 100°C in der Mikrowelle durchgeführt. Entgegen Ansatz (b) zeigte sich bei Ansatz (c) auch nach 24 h kein Umsatz von **BSc4676 (33)**. Die Erhöhung der Temperatur auf erneut 130°C in der Mikrowelle führte nach kurzer Zeit wiederum zu der gleichen Beobachtung wie bei Ansatz (b). Eine Isolierung eines möglichen Produktes war auch bei Ansatz (c) nicht möglich.

Es wird angenommen, dass die Bildung des gewünschten Tetrazols **38** vor allem wegen der komplexen Struktur von **BSc4676 (33)** ausblieb. *Koguro et al.*<sup>[300]</sup> zeigten, dass komplizierte Nitrile mit Aminsäuren, wie  $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$ , in Toluol zu den entsprechenden Tetrazolen umgesetzt werden können. Dabei soll, obwohl Natriumazid in Toluol unlöslich ist, ein kleiner Teil des Natriumazids mit  $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$  reagieren und  $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HN}_3$  bilden. Dieses wiederum löst sich in Toluol und kann mit komplexen Nitrilen ohne Bildung von Nebenprodukten reagieren.<sup>[300]</sup> Bei Ansatz (d) wurde zuerst  $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$  aus Triethylamin und Salzsäure dargestellt und dieses anschließend mit **BSc4676 (33)** und Natriumazid in Toluol bei 100°C gerührt. Bei der Reaktionskontrolle per HPLC konnte jedoch auch nach 48 h kein Umsatz von **BSc4676 (33)** beobachtet werden.

*Sharpless et al.*<sup>[301]</sup> zeigten, dass die Verwendung von Zinksalzen als Katalysatoren die [2+3]-Cycloaddition von elektronenarmen aromatischen Nitrilen mit Natriumazid ermöglicht. Die Reaktion wird in Wasser durchgeführt, wodurch die Bildung von Nebenprodukten vermieden werden soll.<sup>[301]</sup> Ansatz (d) erfolgte in Anlehnung an *Sharpless et al.*<sup>[301]</sup> in  $\text{H}_2\text{O}$  mit Natriumazid als Azidquelle und Zinkbromid als Katalysator. Die Reaktionskontrolle per HPLC zeigte wiederum keine Umsetzung von **BSc4676 (33)**.

In der Arbeitsgruppe *Schmidt* wurde von *Kieser*<sup>[302]</sup> die Synthese von Tetrazolen in ionischen Flüssigkeiten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Umsetzung von Nitrilen mit Natriumazid und Essigsäure in ionischen Flüssigkeiten bei Mikrowellenhitze den herkömmlichen Methoden deutlich überlegen ist.<sup>[302]</sup> In Anlehnung an die Arbeiten von *Kieser*<sup>[302]</sup> wurden die Ansätze (f-h) mit Natriumazid und Essigsäure in der ionischen Flüssigkeit 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-chlorid ([BMIM]Cl) bei

unterschiedlichen Temperaturen in der Mikrowelle durchgeführt. Dennoch konnte in keinem der Versuche eine Umsetzung von **BSc4676 (33)** nachgewiesen werden. Da das gewünschte Tetrazol **38** nicht direkt von **BSc4676 (33)** ausgehend dargestellt werden konnte, wurde eine neue Synthesestrategie erarbeitet (Schema 13).

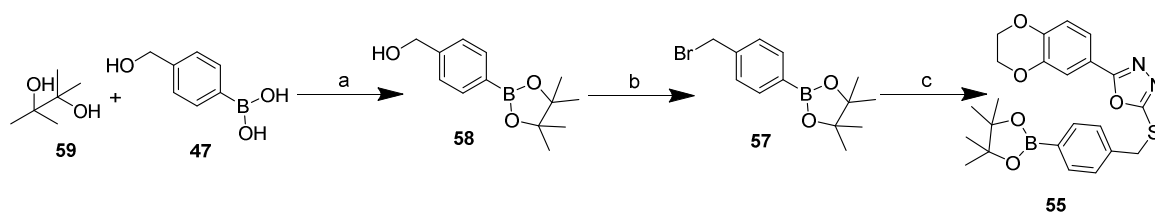


Schema 13: Retrosynthetische Zerlegung der Zielstruktur **38**.



Bei der Retrosynthese des Tetrazols **38** wird zunächst der Tetrazolring mit einer Trityl-Gruppe geschützt (Schema 13). Danach wird die C-C-Bindung zwischen den beiden Phenyl-Ringen gespalten. Dies führt zu den separaten Retrosynthesezweigen des Tetrazol-Bausteins **54** und des Oxadiazolboronsäure-Bausteins **55**. Die Thioetherspaltung von **55** führt zu dem Bromid **57** und dem Oxadiazolthiol **39**, welche wiederum über zwei verschiedene Zweige weiter zerlegt werden. Das Oxadiazolthiol **39** kann analog zur Retrosynthese von **BSc4676 (33)** (siehe Seite 70) weiter zerlegt werden. Die Brom-Gruppe des Bromids **57** wird zunächst in eine Hydroxy-Gruppe umgewandelt und anschließend der Pinakolester gespalten. Dabei wird die Boronsäure **47** erhalten, welche ein Edukt der geplanten Synthese darstellt. Bei dem Tetrazol-Baustein **54** wird zuerst die Trityl-Schutzgruppe abgetrennt, sodass das freie Tetrazol **56** vorliegt. Zuletzt führt die Öffnung des Tetrazol-Rings zum Nitril **46a**. Im Folgenden wird auf die realisierten einzelnen Arbeitsschritte genauer eingegangen.

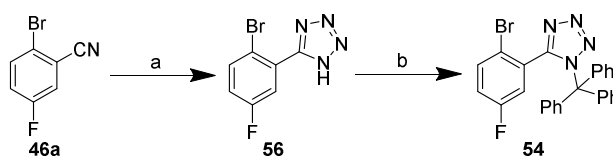
Innerhalb einer mehrstufigen Synthese sollte im letzten Schritt die Verknüpfung der beiden Phenyl-Ringe mittels einer Suzuki-Kupplung erfolgen. Daher muss die Boronsäure-Funktion die Reaktionsbedingungen von mehreren Syntheseschritten überstehen. Im ersten Syntheseschritt wurde daher die Boronsäure **47** durch Veresterung mit Pinakol (**59**) geschützt (Schema 14). Der gewünschte Boronsäureester **56** konnte dabei mit einer Ausbeute von 94% gewonnen werden. Die anschließende Bromierung des Benzylalkohols **58** mit Phosphortribromid zum Benzylbromid **57** gelang quantitativ. Die Verknüpfung des Oxadiazolthiol-Bausteins **39** mit dem Benzylbromid **58** erfolgte unter stark basischen Bedingungen und lieferte den Boronsäureester-Baustein **55**. Bei der Dünnschichtchromatographie des Rohproduktes von **55** war als Nebenprodukt ein Spot auf der Startlinie zu sehen. Daher wird vermutet, dass es zur Bildung von negativ geladenen Lewis-Säure-Basen-Addukten zwischen den Lewis-sauren Boronsäureester **57** und den vorhandenen Hydroxidionen gekommen ist. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte **55** dennoch mit einer Ausbeute von 65% erhalten werden.



Schema 14: Darstellung des geschützten Boronsäure-Bausteins **55**. Reagenzien und Bedingungen: (a) THF, 67°C, 24 h, 94%; (b) PBr<sub>3</sub>, Toluol, 110°C, 4 h, 99%; (c) **39**, 4 N aq NaOH, DMF, RT, 24 h, 65%.

Die Synthese des Tetrazol-Bausteins **54** erfolgte in Anlehnung an die Patentvorschrift WO 2006/081807.<sup>[303]</sup> Durch die 1,3-dipolare Cycloaddition von Azid an die Nitril-Gruppe in **46a** konnte das gewünschte Tetrazol **56** mit einer Ausbeute von 37% gewonnen werden (Schema 15). Die Synthese erfolgte nach *Finnegan et al.*<sup>[304]</sup> mit Natriumazid, Ammoniumchlorid und Lithiumchlorid in DMF.

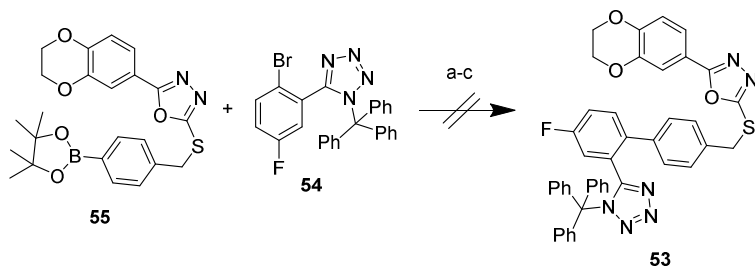
Um die unerwünschte Koordination des freien Amins innerhalb des Tetrazolrings an den Pd-Katalysator in der anschließenden Suzuki-Reaktion zu verhindern, wurde der Tetrazol-Ring in **56** zuvor mit einer Trityl-Gruppe geschützt. Die Umsetzung von **56** mit Tritylchlorid und Triethylamin in DCM lieferte das geschützte Produkt **54** mit einer Ausbeute von 73%.



Schema 15: Darstellung des Trityl-geschützten Tetrazol-Bausteins **54**. Reagenzien und Bedingungen: (a) NaN<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, LiCl, DMF, 100°C, 24 h, 37%; (b) Trt-Cl, Et<sub>3</sub>N, DCM, 0°C-RT, 4 h, 73%.

Im letzten Syntheseschritt sollte die Verknüpfung des geschützten Tetrazols **54** mit der Pinakolboronsäure **55** in einer Pd-katalysierten Suzuki-Reaktion erfolgen. Dabei wurden mehrere Ansätze mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) als Katalysator sowie verschiedenen Basen und Lösungsmittelgemischen durchgeführt. In Tabelle 15 sind die verschiedenen Versuche zusammengefasst.

Tabelle 15: Durchgeführte Experimente zur geplanten Verknüpfung von **55** mit **54** unter Suzuki-Bedingungen.



Ansatz	Katalysator Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> [eq]	Base	LM	Temperatur [°C]	Reaktions- zeit [h]	Ergebnis
(a)	0.05	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.00 eq)	Toluol/H <sub>2</sub> O 2.5:1.0	80	48	Kein Umsatz
(b)	0.15	KOH (1.0 eq)	Dioxan/H <sub>2</sub> O 20:1	MW, 110 HB, 100	2 16	Kein Umsatz, dann Zersetzung
(c)	0.05	CsF (3.0 eq)	THF	MW, 130 HB, 70	0.5 16	Kein Umsatz

In Anlehnung an die zuvor genannte Patentvorschrift WO 2006/081807<sup>[303]</sup> wurde Ansatz (a) mit 5 mol% Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) als Katalysator, Natriumcarbonat als Base und einem Lösungsmittelgemisch aus Toluol und H<sub>2</sub>O im Verhältnis 2.5:1.0 bei 80°C durchgeführt. Bei der Reaktionskontrolle per HPLC konnte auch nach 48 h kein Umsatz der Edukte beobachtet werden.

In der Patentvorschrift WO 2012/000632 A1<sup>[305]</sup> wird eine Suzuki-Reaktion einer Pinakolboronsäure, welche einen freien Tetrazol-Ring in ihrem Strukturgerüst enthält, beschrieben. Daher erfolgte Ansatz (b) in Anlehnung an diese Patentvorschrift WO 2012/000632 A1<sup>[305]</sup> mit Kaliumhydroxid als Base und einem Lösungsmittelgemisch aus Dioxan und H<sub>2</sub>O im Verhältnis 20:1.0 bei 110°C in der Mikrowelle. Nach 2 h in der Mikrowelle zeigte sich keine Umsetzung der Edukte, sodass der Ansatz im Metallheizblock bei 100°C für weitere 16 h weiter gerührt wurde. Bei der Reaktionskontrolle per HPLC zeigten sich anstelle der Pinakolboronsäure **55** zahllose Peaks. Es wird angenommen, dass sich **55** aufgrund der hohen Temperatur zerstört hat.

Es wird vermutet, dass für den fehlenden Umsatz das in **55** enthaltene Schwefelatom verantwortlich sein könnte. Baltus *et al.*<sup>[306]</sup> zeigten eine Reihe an erfolgreichen Suzuki-Reaktionen von Pinakolboronsäuren, welche in ihre Struktur Schwefelatome

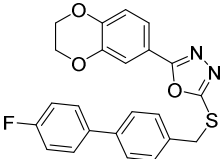
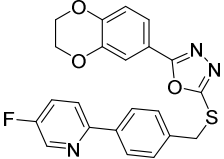
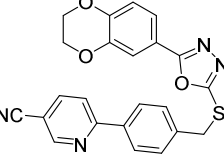
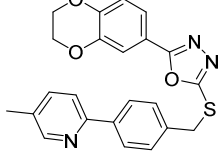
enthielten.<sup>[306]</sup> Folglich wurde Ansatz (c) in Anlehnung an *Baltus et al.*<sup>[306]</sup> mit Caesiumfluorid als Base und THF als Lösungsmittel durchgeführt. Dennoch konnte auch bei dieser Reaktion keine Umsetzung der Edukte beobachtet werden.

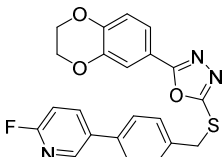
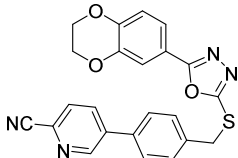
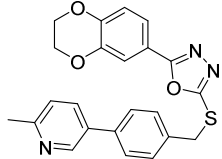
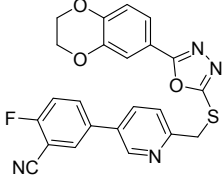
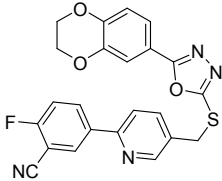
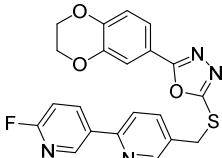
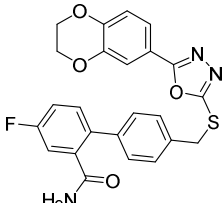
Das Ausbleiben der Suzuki-Reaktion könnte zum einen an dem in **55** enthaltenen Schwefelatom liegen, da Schwefel bekanntermaßen als Katalysatorgift gilt. Zum anderen könnten aber auch sterische Gründe verantwortlich gemacht werden. In *ortho*-Position zum Brom-Substituenten in **54** befindet sich die sehr große tritylgeschützte Tetrazol-Gruppe, welche eine Koordination von **54** an das Pd-Zentrum des Katalysators wahrscheinlich unmöglich macht. Das gewünschte Tetrazol **53** konnte daher innerhalb dieser Arbeit nicht zugänglich gemacht werden.

## Überblick der synthetisierten Zielstrukturen

In Tabelle 16 sind die in diesem Kapitel hergestellten Substanzen sowie die erzielten Ausbeuten und Reinheiten nochmals zusammengefasst.

Tabelle 16: Überblick der synthetisierten Substanzen.

Verbindung	BSc-Nummer	Struktur	Ausbeute [%] <sup>a</sup>	HPLC-Reinheit [%]
<b>34b</b>	<b>BSc5137</b>		48	99
<b>34c</b>	<b>BSc5133</b>		66	96
<b>34d</b>	<b>BSc5132</b>		51	95
<b>34e</b>	<b>BSc5185</b>		27	98

34f	BSc5215		58	98
34g	BSc5216		58	99
34h	BSc5186		12	97
35a	BSc5131		33	98
35b	BSc5217		37	99
35c	BSc5218		31	95
36	BSc5090		78	96

<sup>a</sup> Ausbeute bezogen auf die letzte Synthesestufe.

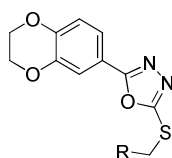
### 3.1.4 *In vitro* Aktivität und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der GSK-3-Inhibitoren

Die Aktivität der erfolgreich synthetisierten Verbindungen gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  wurde von dem Dienstleistungsunternehmen *Cerep* bestimmt. Die Assay Bedingungen werden ausführlich in Abschnitt 5.6.1 beschrieben. Bei den angegebenen Messergebnissen handelt es sich um die prozentuale Inhibition (%-Inhibition) der getesteten Substanz gegenüber der spezifischen Kontrollaktivität (spezifische Aktivität = Aktivität bezogen auf 1 mg Enzym). Für die Ermittlung der Kontrollaktivität wird Staurosporin (IC<sub>50</sub>(GSK-3 $\alpha$ ) = 28 nM, IC<sub>50</sub>(GSK-3 $\beta$ ) = 59 nM) als Assay-interne Referenzsubstanz herangezogen. Die %-Inhibition wird nach Gleichung (II) wie folgt berechnet:

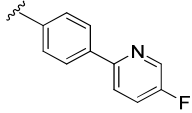
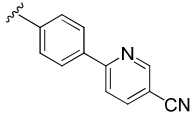
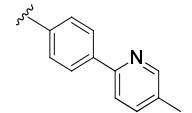
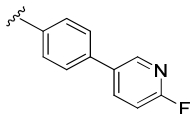
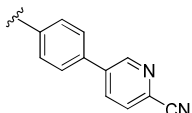
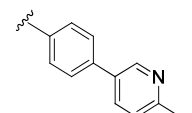
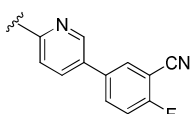
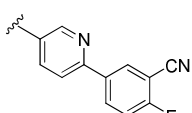
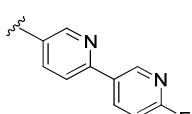
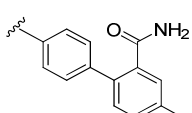
$$\% \text{-Inhibition} = 100 - \left( \frac{\text{gemessene spezifische Aktivität in Anwesenheit des Inhibitors}}{\text{spezifische Kontrollaktivität in Anwesenheit von Staurosporin}} \cdot 100 \right) \quad (\text{II})$$

Damit die Aktivitäten der synthetisierten Derivate direkt mit der Leitstruktur **BSc4676 (33)** verglichen werden konnten, wurde auch **BSc4676 (33)** unter den gleichen Assay-Bedingungen getestet (siehe 5.6.1). Alle Versuche wurden mit einer Konzentration von 1  $\mu$ M der zu testenden Substanz durchgeführt. In Tabelle 17 sind die synthetisierten Oxadiazol-Derivate **BSc4676 (33)**, **34b-h**, **35a-c**, und **BSc5090 (36)** mit der entsprechenden gemessenen %-Inhibition sowie den, mittels *ChemBioDraw Ultra* berechneten, ClogP- und tPSA-Werte zusammengefasst.

Tabelle 17: Inhibitorische Aktivität der synthetisierten Oxadiazol-Derivate **BSc4676 (33)**, **34b-h**, **35a-c**, und **BSc5090 (36)** gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ .



Verbindung	R	ClogP <sup>a</sup>	tPSA <sup>a</sup>	GSK-3 $\alpha$ %-Inhibition	GSK-3 $\beta$ %-Inhibition
				bei 1 $\mu$ M der Testsubstanz	
<b>BSc4676 (33)</b>		4.60	76.2	80	45
<b>BSc5137 (34b)</b>		5.17	52.4	13	6

<b>BSc5133</b> (34c)		3.97	64.8	86	84
<b>BSc5132</b> (34d)		3.37	88.6	86	44
<b>BSc5185</b> (34e)		4.24	64.8	86	88
<b>BSc5215</b> (34f)		3.76	64.8	95	78
<b>BSc5216</b> (34g)		3.36	88.6	58	21
<b>BSc5186</b> (34h)		4.03	64.8	99	89
<b>BSc5131</b> (35a)		3.15	88.6	21	0
<b>BSc5217</b> (35b)		3.36	88.6	49	28
<b>BSc5218</b> (35c)		2.55	77.1	93	75
<b>BSc5090</b> (36)		3.39	95.5	100	97

<sup>a</sup> Berechnet mit *ChemBioDraw Ultra* (Version 13.0.2).<sup>[294]</sup>

Systematisch wurde die biphenylischen Endgruppe der Leitstruktur **BSc4676 (33)** verändert. Die dabei gewonnenen Kenntnisse über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Derivate werden im folgenden Verlauf analysiert.

Der Einfluss des Nitril-Substituenten auf die Aktivität und  $\alpha$ -Selektivität von **BSc4676 (33)** wurde als erstes untersucht. Die komplette Entfernung der Nitril-Gruppe in

Derivat **BSc5137 (34b)** führte zu einem erheblichen Verlust der Aktivität gegenüber beiden Isoformen. Mit einer %-Inhibition von 13% gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und 6% gegenüber der GSK-3 $\beta$  besitzt **BSc5137 (34b)** jedoch immer noch eine leichte  $\alpha$ -Selektivität.

Die potenteste Verbindung der Reihe wurde durch den Austausch des Nitril-Substituenten durch eine Amid-Gruppe in **BSc5090 (36)** erzielt. Die %-Inhibition von **BSc5090 (36)** liegt bei 100% gegenüber GSK-3 $\alpha$  und bei 97% gegenüber GSK-3 $\beta$ .

Die Substitution des äußeren Phenyl-Rings durch 3-Fluorpyridin in **BSc5133 (34c)** und 2-Fluorpyridin in **BSc5215 (34f)** führte zu einem Anstieg der Inhibition der GSK-3 $\beta$ . Die Aktivität der beiden Derivate gegenüber der GSK-3 $\alpha$  nahm nur leicht zu. Bei **BSc5215 (34f)** erhöht sich dies jedoch etwas stärker als bei **BSc5133 (34c)**.

Infolgedessen wurde der Pyridin-Ring durch den Phenyl-Ring ersetzt und die Nitril-Gruppe auf die *meta*-Position zum inneren Phenyl-Ring verschoben. Aufgrund der synthetischen Ausführbarkeit musste gleichzeitig der innere Phenyl-Ring der biphenylischen Endgruppe zu einem 2-Pyridin in **BSc5217 (35b)** und 3-Pyridin in **BSc5131 (35a)** angepasst werden. In beiden Fällen führte die Veränderung zu einem immensen Verlust der hemmenden Wirkung gegenüber GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ . Bereits das Docking der beiden Derivate lässt eine Abnahme der Aktivität vermuten (Abbildung 24A). Aus sterischen Gründen muss sich der *meta*-Nitril-Rest von **BSc5131 (35a)** (cyan) und **BSc5217 (35b)** (magenta) in Richtung der Taschenmitte drehen. Dadurch dreht sich die gesamte biphenylische Endgruppe. Aufgrund der gedrehten Orientierung der Endgruppe kann keiner der beiden aromatischen Ringe mit den nahegelegenen Aminosäureresten der ATP-Bindungstasche, wie Phe67 und Gln185, interagieren. Durch die Bildung einer Wasserstoffbrücke mit Arg141 zeigt **BSc5217 (35b)** eine geringe Aktivität gegenüber der GSK-3 $\beta$ . Auch diese Wechselwirkung fehlt bei **BSc5131 (35a)**, sodass die GSK-3 $\beta$  von **BSc5131 (35a)** überhaupt nicht inhibiert wird.



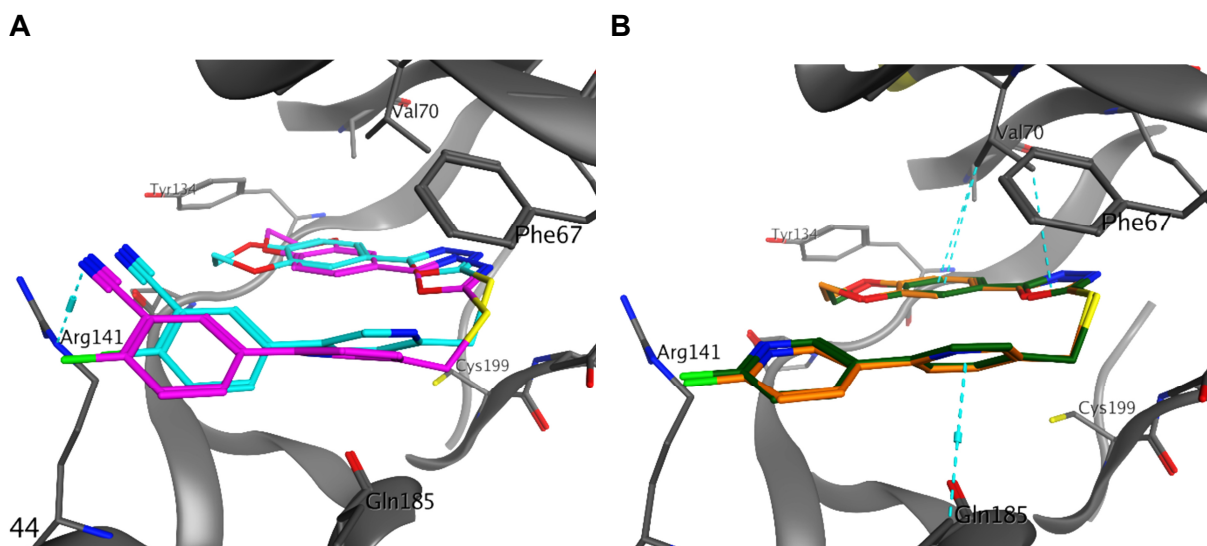


Abbildung 24: Protein/Liganden-Docking verschiedener Inhibitoren in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88). (A) Vergleich der Bindungsgeometrien von **BSc5131 (35a)** (cyan) und **BSc5217 (35b)** (magenta). (B) Vergleich der Bindungsgeometrien von **BSc5218 (35c)** (orange) und **BSc5215 (34f)** (grün). Verwendete Software: *MOE 2014.0901*.

Die Einführung eines zweiten 2-Pyridin-Rings (**BSc5218 (35c)**) in die Struktur von **BSc5215 (34f)** zeigte, dass die inneren Pyridin-Ringe keinen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität der Derivate gegenüber GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  haben, da **BSc5218 (35c)** (orange) und **BSc5215 (34f)** (grün) gleich stark inhibieren. Die Annahme, dass der *meta*-Nitril-Rest in **BSc5131 (35a)** und **BSc5217 (35b)** für den starken Rückgang der Aktivität verantwortlich ist, konnte somit sowohl im Docking (Abbildung 24B) als auch experimentell bestätigt werden.

Zuletzt wurde der Einfluss der Fluor-Gruppe auf die Kinaseaktivität und  $\alpha$ -Selektivität der Derivate analysiert. Dazu wurde die Fluor-Gruppe innerhalb der Pyridine **BSc5215 (34f)** und **BSc5133 (34c)** durch eine elektronenschiebende Methyl-Gruppe substituiert. Die dadurch resultierenden Derivate **BSc5185 (34e)** und **BSc5186 (34h)** zeigen im Vergleich zu **BSc5215 (34f)** und **BSc5133 (34c)** eine leicht gesteigerte Aktivität gegenüber GSK-3 $\beta$ . Die Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  wurde nicht beeinflusst. Mit einer prozentualen Inhibition um 86% gegenüber GSK-3 $\alpha$  und 88% gegenüber GSK-3 $\beta$  werden beide Isoformen von **BSc5185 (34e)** gleich stark inhibiert. Folglich wurde durch die Methyl-Substituenten in **BSc5185 (34e)** und **BSc5186 (34h)** die Differenzierung zwischen den Isoformen abgeschwächt und die angestrebte  $\alpha$ -Selektivität konnte nicht erlangt werden.

Durch die Substitution der Fluor-Gruppe der Pyridine **BSc5215 (34f)** und **BSc5133 (34c)** durch eine elektronenziehende Nitril-Gruppe in **BSc5132(34d)** und

**BSc5216(34g)** nahm die Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  ab. Dennoch zeigten beide Verbindungen, **BSc5132(34d)** und **BSc5216(34g)**, die stärkste Differenzierung zwischen den Isoformen sowie die gesuchte Selektivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$ . Im Fall der Inhibition der  $\beta$ -Isoform haben sich beide Derivate unterschiedlich verhalten. Das Docking von **BSc5132(34d)** und **BSc5216(34g)** in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  lässt vermuten, dass die Nitril-Substituenten durch die Bildung einer Wasserstoffbrücke mit Arg144 zu der Aktivität der Verbindungen beitragen.

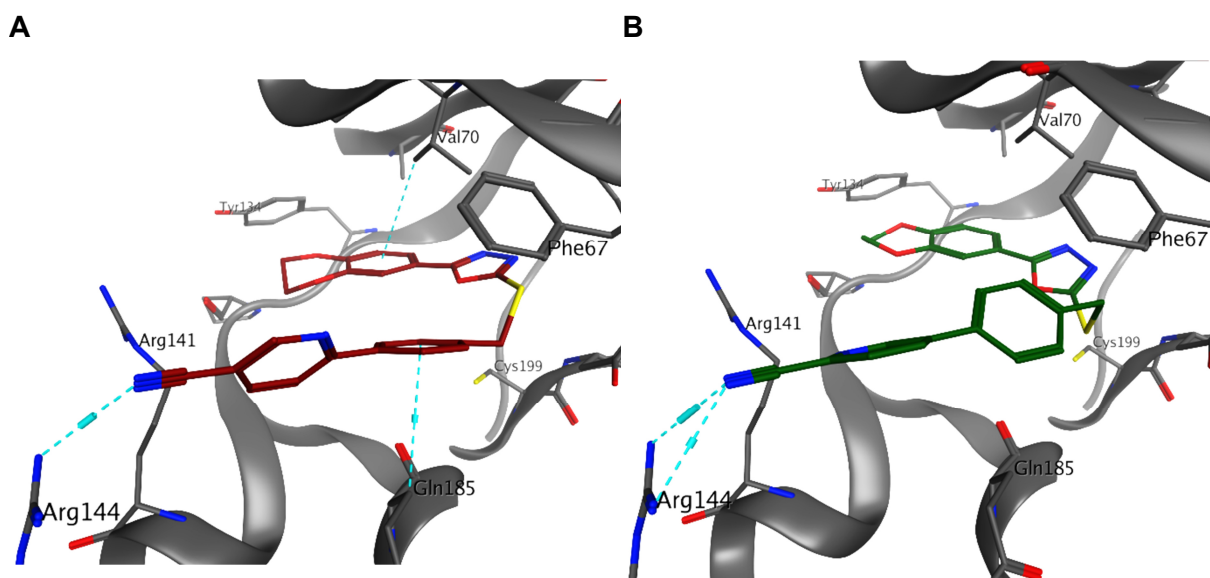


Abbildung 25: Protein/Liganden-Docking von **BSc5132 (34d)** (A) und **BSc5216(34g)** (B) in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88). Verwendete Software: *MOE 2014.0901*.

Dennoch wird eine unterschiedliche Aktivität beider Derivate aufgrund der unterschiedlichen Drehung der biphenylischen Endgruppe prognostiziert. Der biphenylische Rest von **BSc5216(34g)** ist im Vergleich zu **BSc5132(34d)** um ungefähr 60° gedreht. Der innere Phenyl-Ring von **BSc5132(34d)** zeigt mit Gln185 eine H- $\pi$ -Wechselwirkungen (Abbildung 25A). Aufgrund der Drehung der Phenyl-Ringe kann **BSc5216(34g)** jedoch keine H- $\pi$ -Wechselwirkungen mit Gln185 eingehen (Abbildung 25B). Folglich wird für **BSc5132(34d)** eine bessere Interaktion mit der aktiven Tasche als für **BSc5216(34g)** vorhergesagt und eine höhere Aktivität gegenüber GSK-3 $\beta$  erwartet. Diese Annahme konnte experimentell bestätigt werden. **BSc5132(34d)** weist mit einer %-Inhibition von 44% gegenüber der GSK-3 $\beta$  die gleiche Aktivität wie die Leitstruktur **BSc4676 (33)** auf. **BSc5216(34g)** hingegen wirkt mit einer %-Inhibition von 21% nur sehr schwach inhibierend auf die GSK-3 $\beta$ .

### 3.1.5 Mögliche Ursachen für die $\alpha$ -Selektivität der GSK-3-Inhibitoren

Mit dem Ziel die Unterschiede zwischen beiden Isoformen der GSK-3 besser zu verstehen, wurde ein Homologiemodell der GSK-3 $\beta$  und der GSK-3 $\alpha$  erstellt. Dazu wurde ein *Alignment* der Aminosäuresequenz der GSK-3 $\alpha$  (UniProtKB P49840) an die 3D-Struktur der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88) durchgeführt. Hierfür wurde die Software *MOE 2014.0901* verwendet. Die Sequenzidentität zwischen GSK-3 $\beta$  und GSK-3 $\alpha$  wird von MOE auf 86% berechnet (siehe Abschnitt 5.1.4). Jedoch sind die meisten Sequenzunterschiede zwischen den beiden Isoformen außerhalb der ATP-Bindungstasche (Abbildung 26). Somit ergibt sich eine Sequenzhomologie von 98% innerhalb der ATP-Bindungstasche. Die 2% unterschiedlichen Aminosäuren sind außerdem von der Tasche weggerichtet, sodass unmöglich direkte Wechselwirkungen mit diesen aufgebaut werden können.

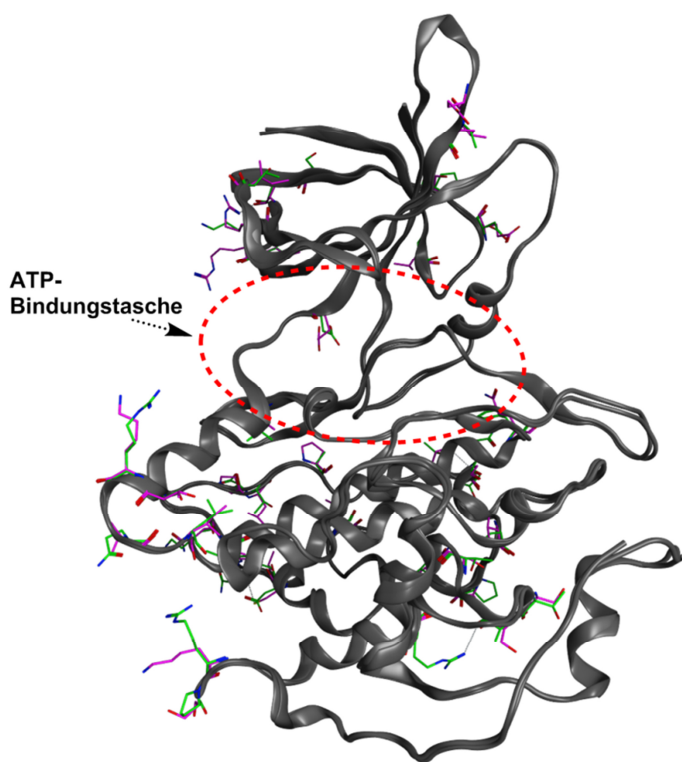


Abbildung 26: Homologiemodell basierend auf der 3D-Struktur der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88) und der überlagerten Aminosäuresequenz der GSK-3 $\alpha$  (UniProtKB P49840). Aminosäurepositionen in denen sich beide Isoformen unterscheiden sind farblich hervorgehoben. GSK-3 $\beta$ : Grün und GSK-3 $\alpha$ : Pink. Verwendete Software: *MOE 2014.0901*.

Außerhalb der ATP-Bindungstasche befindet sich in der Arg-reichen Schleife die am nächsten gelegene Position an der beide Isoformen verschiedene Aminosäuren besitzen. Innerhalb der GSK-3 $\beta$  liegt an dieser Position das Arg148 und bei der GSK-3 $\alpha$  das Lys211. Verbindung **BSc5132 (34d)** zeigt bei den *in vitro* Untersuchungen die größte Differenzierung zwischen beiden Isoformen. Das Docking

von **BSc5132 (34d)** in das generierte Homologiemodell veranschaulicht, dass genau diese Position in der Arg-reichen Schleife entscheidend für die Isoform-Selektivität der synthetisierten Inhibitoren ist (Abbildung 27A).

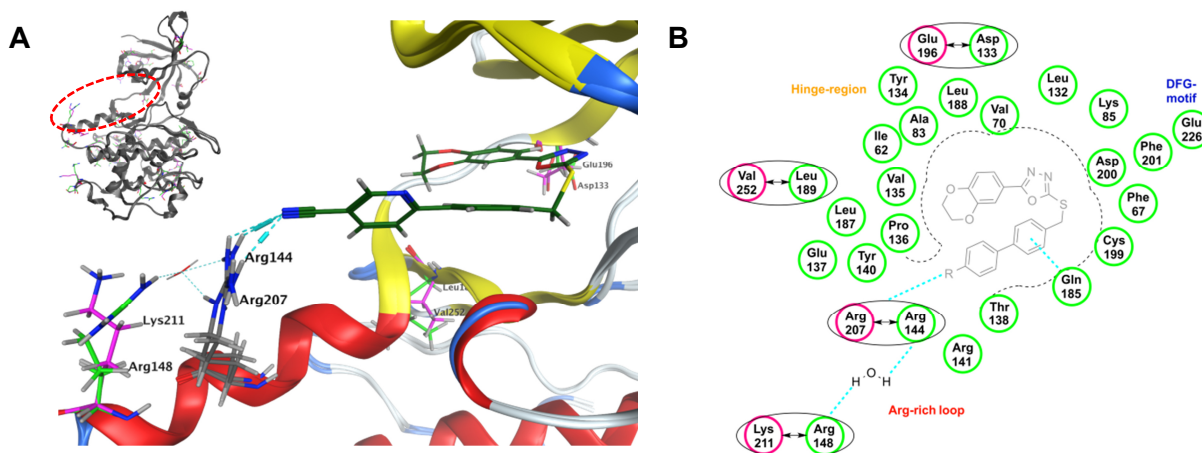


Abbildung 27: (A) Protein/Liganden-Docking von **BSc5132 (34d)** in das Homologiemodell der GSK-3β (PDB Code 3F88) und der überlagerten Aminosäuresequenz der GSK-3α (UniProtKB P49840). Aminosäurepositionen in denen sich beide Isoformen unterscheiden sind farblich hervorgehoben. GSK-3β: Grün und GSK-3α: Pink. (B) Schematische Darstellung der Selektivitätshypothese der α-selektiven Oxadiazol-Inhibitoren. Verwendete Software: *MOE* 2014.0901. Kopie aus Neumann et al., *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8907.<sup>[205]</sup> Mit freundlicher Genehmigung von *ACS Publications* [RightsLink® by Copyright Clearance Center].

Das Docking von **BSc5132 (34d)** prognostiziert eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Nitril-Substituent und Arg144 in der GSK-3β sowie Arg207 innerhalb der GSK-3α. Arg144 und Arg207 liegen beide an der gleichen Position innerhalb der jeweiligen Arg-reichen Schleife der Isoformen. In der darauffolgenden Windung der Helix, befinden sich auf gleicher Höhe zu Arg144 und Arg207 und somit räumlich benachbart, Arg148 (grün, Abbildung 27A) in der GSK-3β und Lys211 (pink, Abbildung 27A) in der GSK-3α. Innerhalb der GSK-3β wird eine Interaktion über ein koordiniertes Wassermolekül zwischen Arg144 und Arg148 durch das Docking vorhergesagt. Die beiden benachbarten Aminosäuren innerhalb der GSK-3α, Arg207 und Lys211, interagieren hingegen nicht miteinander. Daher wird vermutet, dass die durch ein Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrücke zwischen Arg144 und Arg148 für die Isoform-Selektivität von **BSc5132 (34d)** verantwortlich ist. Die Seitenketten der Arg-reichen Schleife sind von Lösungsmittel umgeben und dadurch höchstwahrscheinlich sehr flexibel. Die Wasser-vermittelte Wasserstoffbrücke zwischen Arg144 und Arg148 begrenzt vermutlich die Beweglichkeit der Seitenkette. Dies verursacht möglicherweise ein konformationelles entropisches Defizit. Dies könnte jeglichen Energiegewinn, welcher durch die Bindungsenergie der Protein-

---

Ligand-Wechselwirkung gewonnen wurde, wieder aufheben. Infolgedessen wird für **BSc5132 (34d)** eine schwächere inhibitorische Wirkung gegenüber der GSK-3 $\beta$  als gegenüber der GSK-3 $\alpha$  prognostiziert. Die vorhergesagte stärkere Hemmung der GSK-3 $\alpha$  im Vergleich zur GSK-3 $\beta$  konnte für **BSc5132 (34d)** mit einer prozentualen Inhibition von 86% der GSK-3 $\alpha$  und von 44% der GSK-3 $\beta$  experimentell nachgewiesen werden.

Für die Erklärung der Isoform-Selektivität der Inhibitoren wird daher folgende Hypothese aufgestellt. Die Isoform-Selektivität wird aufgrund der beiden unterschiedlichen Aminosäuren, Arg148 (grün) und Lys211 (pink), innerhalb der Arg-reichen Schleife hervorgerufen. Demzufolge wird dem *para*-Substituenten der biphenylischen Endgruppe innerhalb der Inhibitoren eine Schlüsselfunktion für deren Isoform-Selektivität zugeschrieben (Abbildung 27B).

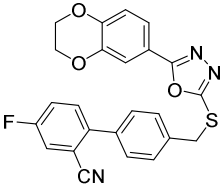
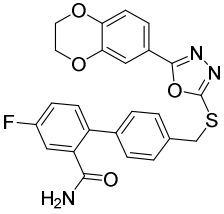
Selbstverständlich handelt es sich hierbei nur um eine spekulative Hypothese, welche durch weitere theoretische und praktische Arbeiten bestätigt werden müsste.

Letztendlich würde die kristallographische Aufklärung der Tertiärstruktur der GSK-3 $\alpha$  die Antwort auf die Selektivitätsfrage der Oxadiazol-Inhibitoren geben. Außerdem würde eine Röntgenkristallstruktur der GSK-3 $\alpha$  die zukünftige Entwicklung von GSK-3 $\alpha$ -selektiven Inhibitoren bedeutend vorwärts bringen.

### 3.1.6 IC<sub>50</sub>-Werte von BSc5090 (36) gegenüber der GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ im Vergleich zu BSc4676 (33)

Für einen präziseren Vergleich der inhibitorischen Wirkung der Leitstruktur **BSc4676** (33) und der aktivsten Verbindung **BSc5090** (36) wurden die IC<sub>50</sub>-Werte gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  von dem Dienstleistungsunternehmen *Cerep* bestimmt. Die Assay-Bedingungen und die Auswertung der einzelnen Messwerte werden ausführlich in Abschnitt 5.6.1 beschrieben. In Zusammenarbeit mit *Fish et al.* vom *Drug Discovery Institute* des *University College London* wurden für **BSc5090** (36) zusätzlich die IC<sub>50</sub>-Werte gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  in dem kommerziell erhältlichen Z'-LYTE<sup>®</sup> Assay durch das Unternehmen *Life Technologies Ltd.* gemessen (siehe Abschnitt 5.6.2). In beiden durchgeführten Assays wurden die GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Aktivitäten fluorimetrisch nach dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) bestimmt. Da innerhalb der Assays sowohl unterschiedliche Substrate und FRET-Paare als auch verschiedene ATP-Konzentrationen eingesetzt wurden, liefern die Assays unterschiedliche IC<sub>50</sub>-Werte. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der Messungen zusammengefasst.

Tabelle 18: IC<sub>50</sub>-Werte von **BSc4676** (33) und **BSc5090** (36) gegenüber GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ .

Verbindung	Struktur	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\alpha$ [nM] <i>Cerep</i>	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\beta$ [nM] <i>Cerep</i>	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\alpha$ [nM] <i>Z'-LYTE</i>	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\beta$ [nM] <i>Z'-LYTE</i>
<b>BSc4676</b> (33)		230	>1000	n.d.	n.d.
<b>BSc5090</b> (36)		42	140	4.76	17.10

Im Vergleich zur Leitstruktur **BSc4676** (33) konnte mit dem neuen Inhibitor **BSc5090** (36) sowohl die Aktivität gegenüber den beiden Isoformen als auch die Selektivität gegenüber der  $\alpha$ -Isoform verbessert werden. Mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 42 nM gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und 140 nM gegenüber der GSK-3 $\beta$  wird die  $\alpha$ -Isoform von



**BSc5090 (36)** 3-mal stärker inhibiert als die  $\beta$ -Form. Den gleichen Trend zeigen die  $IC_{50}$ -Werte aus dem Z'-LYTE Assay. Dabei weist **BSc5090 (36)** einem  $IC_{50}$ -Wert von 4.76 nM gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und 17.10 nM gegenüber der GSK-3 $\beta$  auf. Somit liegt auch hier eine 3-mal stärkere Inhibition der GSK-3 $\alpha$  als der GSK-3 $\beta$  vor.

### 3.1.7 Selektivität von **BSc5090 (36)** gegenüber anderen Kinasen

Das vorrangige Ziel der Entwicklung von Wirkstoffen auf dem Weg zum Medikament ist das Erlangen einer möglich hohen Selektivität gegenüber der entsprechenden Zielstruktur. Innerhalb des Organismus kann der Wirkstoff mit vielen verschiedenen Strukturen, wie beispielsweise DNA, RNA, Lipiden und Proteinen, interagieren. Die Reaktivität gegenüber anderen Strukturen kann zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Idealerweise bindet ein Wirkstoff daher nur an die Zielstruktur, welche für die gewünschte Wirkung verantwortlich ist.<sup>[307]</sup>

Besonders für Zielstrukturen, welche zu großen Familien an strukturell und funktionell verwandten Proteinen gehören, ist eine hohe Selektivität schwer zu erreichen.<sup>[308]</sup> Dies gilt auch für Kinasen, da die ATP-Bindungstaschen aller Kinasen evolutionär bedingt stark konserviert vorliegen.<sup>[223-224]</sup> Für eine potentielle Weiterentwicklung eines ATP-kompetitiven Kinase-Inhibitors ist daher dessen Selektivität gegenüber anderen Kinasen entscheidend.

Innerhalb der entwickelten GSK-3-Inhibitoren ist **BSc5090 (36)** die potenteste Verbindung und wurde daher für die Selektivitätsprüfung ausgewählt. **BSc5090 (36)** wurde in einem sogenannten *Kinase Selectivity Panel* (auch als *Kinase Profiling* oder *Kinase Screening* bezeichnet) auf dessen Hemmwirkung gegenüber eng verwandten Kinasen der GSK-3, wie beispielsweise verschiedene CDKs, sowie wichtigen Vertretern anderer Kinasefamilien getestet. Diesbezüglich wurde die %-Inhibition von **BSc5090 (36)** gegenüber 50 Kinasen (inklusive GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ ) bei einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu$ M bestimmt (Abbildung 28). Das Kinasescreening erfolgte durch das Unternehmen *Life Technologies Ltd.* (siehe Abschnitt 5.6.2) in Kooperation mit *Fish et al.* vom *Drug Discovery Institute* des *University College London*. Das Selektivitätsprofil von **BSc5090 (36)** zeigt eine exzellente Selektivität gegenüber den beiden Isoformen der GSK-3 (Abbildung 28). 48 der 50 Kinasen weisen eine %-Inhibition von  $\leq 13\%$  auf. Ergebnisse mit einer %-Inhibition  $< 25\%$  werden als unerheblich erachtet, da sie den Schwankungen des Signals rund um den Kontrollwert

zugeschrieben werden. Daher lässt sich schließen, dass 48 der 50 Kinasen durch **BSc5090 (36)** nicht inhibiert werden. Die GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  waren die einzigen Kinasen, welche hierbei durch **BSc5090 (36)** stark gehemmt wurden. Beide Isoformen weisen eine %-Inhibition von 96% auf. **BSc5090 (36)** kann daher als selektiv gegenüber den beiden Isoformen der GSK-3 bezeichnet werden, wobei die deutliche GSK-3 $\alpha$  Selektivität von **BSc5090 (36)** bereits anhand der IC<sub>50</sub>-Werte gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.6).

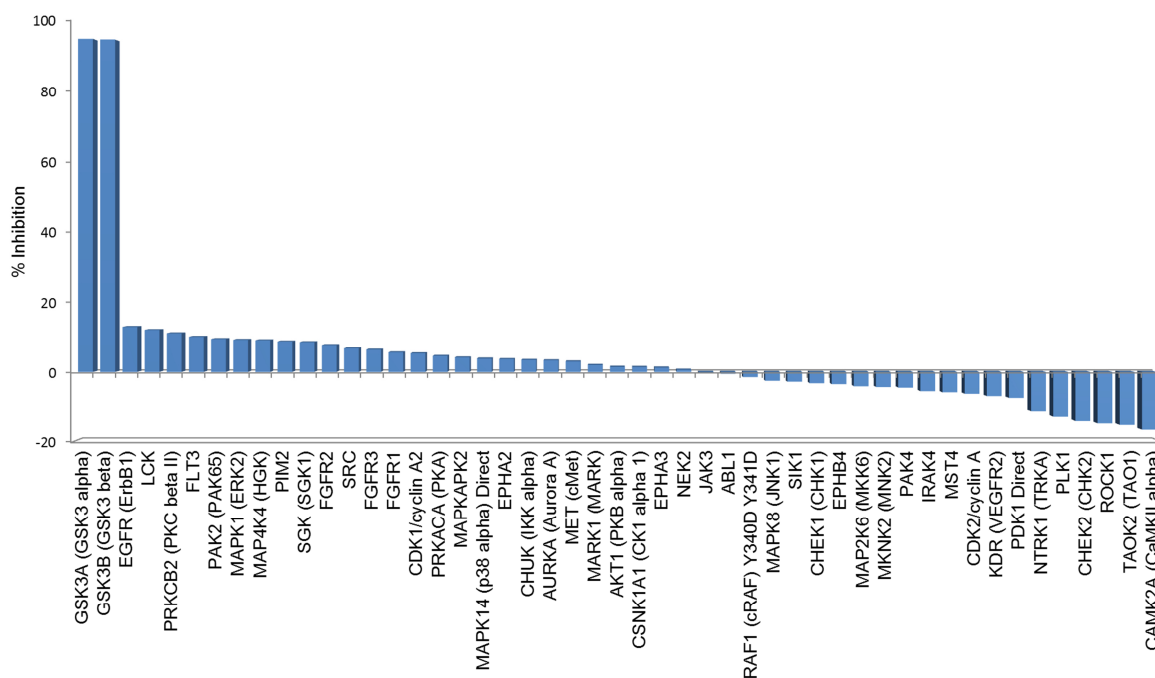


Abbildung 28: Selektivitätsscreening von **BSc5090 (36)** gegenüber 50 verschiedenen Kinasen. Die Balken entsprechen der %-Inhibition der Kinasen bei einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu$ M.

### 3.1.8 Löslichkeit ausgewählter GSK-3-Inhibitoren

Damit eine Verbindung als Wirkstoff erfolgreich ist, muss diese zunächst an den gewünschten Wirkort gelangen, um dort an das Zielprotein binden zu können. Die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffs hängt vor allem von dessen physikochemischen Eigenschaften, wie der Löslichkeit, der Lipophilie und der Azidität bzw. Basizität, ab. Der entscheidendste physikochemische Parameter für eine ausreichende Bioverfügbarkeit einer Substanz ist die Wasser-Löslichkeit, da nur gelöste Stoffe über die Blutbahn im Körper verteilt werden und somit an den Wirkort gelangen können. Eine hohe Wasser-Löslichkeit ist daher essentiell für die Effektivität eines Wirkstoffs innerhalb eines Organismus.



Um die Löslichkeitseigenschaften der synthetisierten Oxadiazol-Derivate zu beurteilen wurden ihre ClogP-Werte berechnet und deren Löslichkeit mit Hilfe der *Shake-Flask*-Methode<sup>[309]</sup> bestimmt. Da die Wasser-Löslichkeit zusätzlich als Auswahlkriterium potentieller Verbindungen für die weitere Evaluation der Oxadiazol-Derivate in zellulären und *in vivo* Assays dient, wurde nur die Löslichkeit der aktivsten Oxadiazol-Derivate **BSc4676 (33)**, **34c-h**, **35c** und **BSc5090 (36)** gemessen. Die Durchführung der *Shake-Flask*-Methode wird ausführlich in Abschnitt 5.5 beschrieben. Entsprechend der *in vivo* Assay-Bedingungen wurden die Messungen in VE-Wasser mit 2 Vol% DMSO durchgeführt.

Tabelle 19: Wässrige Löslichkeit von ausgewählten Verbindungen. Die Löslichkeitsbestimmung wurde mit Hilfe der *Shake-Flask*-Methode<sup>[309]</sup> und anschließenden HPLC-Messungen durchgeführt. Entsprechend der *in vivo* Assay-Bedingungen wurden alle Proben in VE-Wasser mit 2 Vol% DMSO gelöst.

Verbindung	ClogP <sup>a</sup>	Löslichkeit [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Löslichkeit [ $\mu\text{M}$ ]
<b>BSc4676 (33)</b>	4.60	< 1	1
<b>BSc5133 (34c)</b>	3.97	dec	dec
<b>BSc5132(34d)</b>	3.37	78	181
<b>BSc5185 (34e)</b>	4.24	< 1	1
<b>BSc5186 (34f)</b>	3.76	7	17
<b>BSc5216 (34g)</b>	3.36	21	50
<b>BSc5186 (34h)</b>	4.03	< 1	< 1
<b>BSc5218 (35c)</b>	2.55	< 1	1
<b>BSc5090 (36)</b>	3.39	34	73

<sup>a</sup> Berechnet mit *ChemBioDraw Ultra* (version 13.0.2).<sup>[294]</sup>

Es zeigte sich, dass die berechneten ClogP-Werte mit den gemessenen Werten der wässrigen Löslichkeit korrelieren. So weisen alle Verbindungen mit einem ClogP-Wert größer 4 (**BSc4676 (33)**, **BSc5185 (34e)** und **BSc5186 (34h)**) schlechte Löslichkeiten von  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  (Tabelle 19) auf, eine Ausnahme stellt die unerwartet schlechte Löslichkeit von Verbindung **BSc5218 (35c)** mit dem niedrigsten berechneten ClogP-Wert von 2.55 dar. Die Verbindungen **BSc5185 (34e)**, **BSc5186 (34h)** und **BSc5218 (35c)** sowie **BSc4676 (33)** sind mit einer Löslichkeit von  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  schlecht löslich und somit für die weitere Evaluation in zellulären oder

*in vivo* Assay nicht geeignet. Verbindung **34c** zersetzte sich während der Messung überraschend und schied somit für weitere Testungen aus.

Im Vergleich zur Leitstruktur **BSc4676 (33)** sind die neu entwickelten Oxadiazol-Derivate **BSc5132 (34d)**, **BSc5186 (34f)**, **BSc5216 (34g)** und **BSc5090 (36)** um ein vielfaches wasserlöslicher und können für weitere Testungen in Erwägung gezogen werden.

Das Oxadiazol-Derivat **BSc5216 (34g)** zeigt im Vergleich zu **BSc5186 (34f)** erwartungsgemäß eine höhere Löslichkeit. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Polarität ihrer *para*-Substituenten innerhalb des biphenylischen Gerüsts erklären. Durch die Nitril-Gruppe in **BSc5216 (34g)** im Vergleich zur Fluor-Gruppe in **BSc5186 (34f)** besitzt **BSc5216 (34g)** eine höhere Polarität. Daraus ergibt sich für **BSc5216 (34g)** ein niedrigerer ClogP-Wert sowie eine bessere Löslichkeit

Obwohl der ClogP-Wert von **BSc5132 (34d)** fast identisch mit den Werten von **BSc5216 (34g)** und **BSc5090 (36)** ist, besitzt **BSc5132 (34d)** mit 78 µg/mL eine unerwartet bessere Löslichkeit als **BSc5216 (34g)** mit 21 µg/mL und **BSc5090 (36)** mit 34 µg/mL. Erstaunlich ist dabei vor allem die unterschiedliche Löslichkeit von **BSc5132 (34d)** und **BSc5216 (34g)**, da sich beide Strukturen nur in der Position des Stickstoff-Atoms innerhalb des terminalen Pyridin-Rings unterscheiden. Es wird angenommen, dass das Stickstoff-Atom aufgrund seines freien Elektronenpaares die Orientierung der benachbarten Pyridin- und Phenyl-Rings beeinflusst. Möglicherweise stehen in **BSc5132 (34d)** im Vergleich zu **BSc5216 (34g)** die benachbarten aromatischen Ringe nicht planar zueinander, wodurch eine ausgeprägte  $\pi$ - $\pi$ -Stapelung in der Molekülpackung verhindert und somit die wässrige Löslichkeit deutlich erhöht wird.

Die unterschiedliche Löslichkeit von **BSc5132 (34d)** und **BSc5090 (36)** lässt sich auf den Amid-Substituenten in **BSc5090 (36)** zurückführen. In der Molekülpackung von **BSc5090 (36)** können benachbarte Moleküle über ihre Amid-Gruppen intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden, welche beim Lösen in Wasser gebrochen werden müssen. Folglich ist **BSc5090 (36)** schlechter löslich als **BSc5132 (34d)**.

Die Derivate **BSc5132 (34d)** und **BSc5090 (36)** sind nicht nur die potentesten Verbindungen sondern mit einer wässrigen Löslichkeit von 78 µg/mL und 34 µg/mL

auch am besten wasserlöslich. Infolgedessen wurde im weiteren Verlauf die *in vivo* und zelluläre Wirksamkeit von BSc5132 (34d) und BSc5090 (36) getestet.

### 3.1.9 *In vivo* Evaluation der GSK-3-Inhibitoren am Zebrafisch-Embryo

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) oder Zebrafärbling ist ein kleiner, tropischer Süßwasserfisch, welcher in Pakistan und Indien beheimatet ist.<sup>[310-311]</sup> Natürlich kommen unterschiedliche Linien, welche sich in ihrer Pigmentierung unterscheiden, vor. Innerhalb der Arbeitsgruppe Schmidt werden der *Danio rerio wild* und der *Danio rerio gold* gehalten.

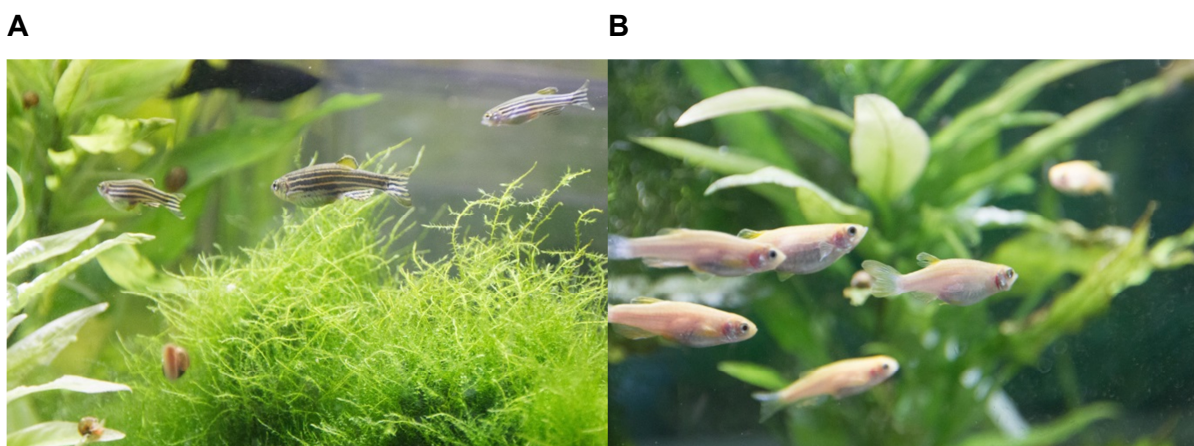


Abbildung 29: Unterschiedliche Arten des Zebrafärblings. (A) *Danio rerio wild* mit blau-schwarzen Streifen. (B) *Danio rerio gold* mit gelb-goldenen Streifen.

Der Zebrafisch gehört zu der Familie der karpfenartigen Fische (Cyprinidae).<sup>[311]</sup> Das Genom des Zebrafisches umfasst 1.7 Milliarden Basenpaare und wurde vollständig entschlüsselt. Somit ist das Genom des Zebrafisches nur halb so groß wie das des Menschen. Dennoch existieren von circa 70% der menschlichen Protein-kodierten Gen-Sequenzen entsprechende homologe Sequenzen im Zebrafisch.<sup>[312]</sup> Aufgrund der kleinen Größe, der günstigen und einfachen Haltung, der genetischen Manipulierbarkeit und der einfach zugänglichen Embryologie sind Zebrafische ein sehr beliebter Modellorganismus.<sup>[310-311]</sup>

Besonders bei der Wirkstoffentwicklung hat sich die Zebrafischlarve als *in vivo* Modell etabliert. Die Zebrafisch-Embryonen-Assays ermöglichen bereits frühzeitig potentielle Wirkstoffe auf ihre Wirkung, Permeabilität und Toxizität am lebenden Organismus zu untersuchen. Dabei wird die Entwicklung der Larven in wässrigen Wirkstoffkonzentrationen verfolgt und entstehende Phänotypen interpretiert.<sup>[310-311]</sup>

Ein gesundes ausgewachsenes Weibchen kann pro Woche bis zu 200 Eier legen, welche außerhalb der Mutter befruchtet werden und leicht aus dem Laichbecken entnommen werden können. Die Laichablage erfolgt bei einem 12 h/12 h Lichtzyklus innerhalb den ersten 2 h nach dem Einschalten des Lichts. Der Zeitpunkt der Laichablage und der Befruchtung ist als Nullte/r Stunde/Tage nach der Befruchtung (*hours/days post fertilization*, hpf/dpf) definiert. Die embryonale Entwicklung verläuft sehr rasch und kann wegen der Transparenz der Eihülle (Chorion) und des Embryos am Mikroskop verfolgt werden. Aufgrund der raschen Entwicklung kommt es zu einer schnellen Bildung von eigenständigen Organen und Gewebe, welche in ihren physiologischen Funktionen den menschlichen Pendanten entsprechen. So sind bereits 2 dpf beispielsweise Gehirn, Herz, Leber, Augen und viele andere Organe erkennbar.<sup>[310-311]</sup>

Zwischen 2-3 dpf beginnen die Larven zu schlüpfen. Ab 5 dpf ist die Zebrafischlarve selbständig in der Lage Nahrung aufzunehmen. Erkennbar ist dies dadurch, dass sich der Embryo vom schützenden Chorion befreit hat, sich nicht mehr vom Dottersack ernährt und der Kiefer sich zur Nahrungsaufnahme ausgebildet hat.<sup>[310-311]</sup> Das europäische Parlament setzt mit Richtlinie 2010/63/EU definierte Standards für den Umgang mit Tieren für wissenschaftliche Forschungszwecke. Diese Richtlinie besagt, dass selbige ab dem Zeitpunkt gültig wird, sobald die Larvenform selbständig in der Lage ist Nahrung in der unmittelbaren Umgebung ausfindig zu machen und aufzunehmen.<sup>[313]</sup> Dementsprechend sind Experimente am Zebrafisch, die den fünften Tag der Embryonalentwicklung überschreiten, ein genehmigungspflichtiger Tierversuch. Die Tierhaltung, die Laichprozedur und die Durchführung des Phänotyp-basierten Embryonen-Assay erfolgt unter strenger Rücksichtnahme dieser Richtlinie und sind in Abschnitt 5.8 genauer beschrieben.

In der embryonalen Entwicklung des Zebrafisches ist der Wnt-Signalweg für viele Vorgänge, wie beispielsweise die Ausbildung der Körperachse, verantwortlich.<sup>[314]</sup> Der Signalweg wird vor allem durch die GSK-3 beeinflusst.<sup>[315]</sup> Kommt es zur Inhibition der GSK-3 während der embryonalen Entwicklung des Zebrafisches entwickeln sich die Larven abnormal.<sup>[314, 316]</sup> Es bildet sich der spezifische Phänotyp mit einer Rückgratsverkrümmung aus. Auf diese Weise kann die *in vivo* Wirksamkeit des Inhibitors belegt werden.

---

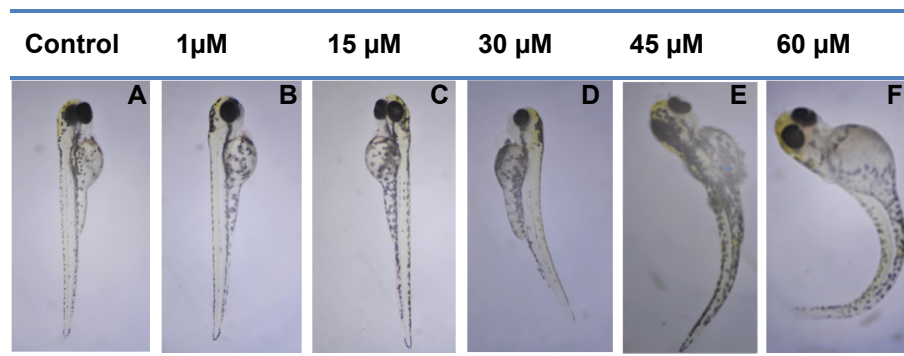
Die beiden potentesten und am besten wasserlöslichen Verbindungen **BSc5132 (34d)** und **BSc5090 (36)** wurden auf ihre *in vivo* Wirksamkeit am Zebrafisch-Embryo (*Danio rerio gold*) getestet. Die Entwicklung der Zebrafischembryonen wurde dabei in unterschiedlich konzentrierten wässrigen Inhibitor-Lösungen (1  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 45  $\mu$ M und 60  $\mu$ M) innerhalb der ersten 5 d (antragsfreie Experimente) verfolgt und entstandene Phänotypen analysiert.

Über den gesamten Konzentrationsbereich zeigte sich innerhalb des Beobachtungszeitraums bei beiden Verbindungen keine Letalität. Das bedeutet, dass keine Koagulation (Zersetzung des Embryos im Ei), kein Ausbleiben des Herzschlags und auch keine gestörte Spontanbewegung zu beobachten war. Aufgrund der geringen wässrigen Löslichkeit von **BSc5132 (34d)** und **BSc5090 (36)** konnte keine Konzentration >60  $\mu$ M angesetzt werden, ohne die unbedenkliche Maximal-Konzentration von 2 Vol% DMSO zu überschreiten. Somit konnte die toxikologisch unbedenkliche Wirkstoffkonzentrations-Obergrenze von beiden Substanzen nicht ermittelt werden.

Bei Verbindung **BSc5132 (34d)** konnte über den gesamten Konzentrationsbereich keine phänotypische Anomalität gegenüber der Kontrolle (E3-Medium plus 2 Vol% DMSO) beobachtet werden. Bei den durchgeführten Experimenten befindet sich der zu testende Inhibitor innerhalb des wässrigen Mediums, welches die Embryonen umgibt. Voraussetzung für eine Wirkung des Inhibitors ist daher sowohl die Permeabilität durch das Chorion (<3 dpf) als auch durch die Haut oder Kiemen (>3 dpf). Daher wird vermutet, dass **BSc5132 (34d)** wegen mangelnder Permeabilität von den Embryonen nicht aufgenommen wurde.

Auch bei den niedrigeren Konzentrationen zwischen 1 und 15  $\mu$ M von **BSc5090 (36)** konnten keine phänotypischen Anomalitäten oder andere Abweichungen gegenüber der Kontrolle beobachtet werden (Tabelle 20A-C). Ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M **BSc5090 (36)** konnte ab 4 dpf bei den Zebrafischlarven ein gekrümmtes Rückgrat beobachtet werden (Tabelle 20D-F).

Tabelle 20: *In vivo* Wirksamkeit von **BSc5090 (36)** auf die embryonale Entwicklung der goldenen Zebrafischlarven (*Danio rerio gold*). (A) Kontrollembryo mit 2 Vol% DMSO. (B-F) Die Zebrafischembryonen wurden mit steigenden Konzentrationen von **BSc5090 (36)**-Lösungen behandelt (B) 1  $\mu$ M, (C) 15  $\mu$ M, (D) 30  $\mu$ M, (E) 45  $\mu$ M und (F) 60  $\mu$ M. Ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M (D-F) zeigt sich der charakteristische Phänotyp mit gekrümmtem Rückgrat. Das Experiment wurde in Duplikaten pro Konzentration mit je 5 Eiern pro Well durchgeführt. Kopie aus *Neumann et al., J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8907.<sup>[205]</sup> Mit freundlicher Genehmigung von *ACS Publications* [RightsLink® by Copyright Clearance Center].



Durch den beobachteten Phänotyp wird zum einen die Permeabilität von **BSc5090 (36)** durch das Chorion und die Haut und zum anderen die Entwicklungsstörung der Zebrafischlarven durch **BSc5090 (36)** nachgewiesen.

Die Rückgratsverkrümmung der Embryonen hängt vor allem mit der Aktivierung von  $\beta$ -Catenin innerhalb des Wnt-Signalweges zusammen. Es wurde gezeigt, dass die GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ , innerhalb des Wnt-Signalweges funktionell redundant sind.<sup>[174-175]</sup> Dennoch wird für die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin vor allem die GSK-3 $\beta$  verantwortlich gemacht.<sup>[314, 316]</sup> **BSc5090 (36)** besitzt einen IC<sub>50</sub>-Wert von 42 nM gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und 140 nM gegenüber der GSK-3 $\beta$ . Folglich sind die eingesetzten Konzentrationen innerhalb des durchgeführten Zebrafisch-Embryonen-Assays zu hoch um eine isoform-spezifische Selektivität zu erzielen. Bei den ausgebildeten Phänotypen bei Konzentrationen >30  $\mu$ M ist **BSc5090 (36)** somit nicht mehr  $\alpha$ -selektiv. Daher ist das durchgeführte Zebrafisch-Embryonen-Assay zu ungenau, um eine mögliche Isoform-Selektivität zu beweisen. Deshalb wurde **BSc5090 (36)** anschließend in einem Zell-Assay bei niedrigeren Konzentrationen getestet, um die unterschiedliche Wirkung von **BSc5090 (36)** auf die GSK-3 $\alpha$  und die GSK-3 $\beta$  zu vergleichen.



### 3.1.10 Evaluation der GSK-3-Inhibitoren in AML-Zelllinien

Im weiteren Verlauf wurden die beiden potentesten und am besten wasserlöslichen Verbindungen **BSc5132 (34d)** und **BSc5090 (36)** auf ihre Wirksamkeit *in vitro* in Krankheitsmodellen getestet. Die *in vitro* Experimente in AML-Zelllinien wurden von *Lina Benajiba* aus der Arbeitsgruppe *Stegmaier* vom *Dana-Faber Cancer Institute* der *Havard Medical School* in Boston durchgeführt (siehe Abschnitt 5.7).

Für die Untersuchungen wurden zwei AML-Zelllinien (NB4 und HL-60) herangezogen. NB4 und HL-60 sind humane Akute-Promyelozyten-Leukämie-(APL)-Zelllinien. Die HL-60-Zellen stammen aus dem peripheren Blut einer APL-Patientin.<sup>[317]</sup> Die NB4-Zellen hingegen wurden aus dem Knochenmark einer APL-Patientin mit Rezidiv entnommen.<sup>[318]</sup>

Alle Untersuchungen wurden sowohl mit **BSc5132 (34d)** als auch mit **BSc5090 (36)** durchgeführt. **BSc5132 (34d)** zeigte jedoch, wie bereits bei den *in vivo* Tests am Zebrafischembryo, bei keinem einzigen zellulären Experiment einen Effekt. Die zelluläre Wirksamkeit einer Verbindung hängt neben der Wasser-Löslichkeit auch von der Membrangängigkeit ab. Daher wird vermutet, dass die ausgebliebene zelluläre Aktivität von **BSc5132 (34d)** auf eine schlechte Membranpermeabilität zurückzuführen ist. Weiterführend wird nur noch auf die Experimente mit **BSc5090 (36)** genauer eingegangen.

Im ersten Experiment wurden die NB4-Zellen für 24 h mit einer aufsteigenden Inhibitorkonzentration (bis 20  $\mu$ M) sowie DMSO als Kontrolllösung inkubiert. **BSc5090 (36)** zeigte eine spezifische Wirkung auf die GSK-3 $\alpha$  mit einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Phosphorylierung an Tyr279 (p-GSK-3 $\alpha$  Y279) ohne eine relevante Auswirkung auf die Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  an Tyr216 (p-GSK-3 $\beta$  Y216) (Abbildung 30A). Aus dem Verhältnis zwischen p-GSK-3 $\alpha$  Y279 bzw. p-GSK-3 $\beta$  Y216 und der entsprechenden gesamten Kinase (GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$ ) lässt sich diese Beobachtung quantifizieren und graphisch darstellen. Aus dem Balkendiagramm in Abbildung 30B lässt sich die konzentrationsabhängige Abnahme der Phosphorylierung von Tyr279 der GSK-3 $\alpha$  in Anwesenheit von **BSc5090 (36)** ablesen. Diese Beobachtung ist sehr bedeutend, da die Aktivität der beiden Isoformen durch die Phosphorylierung des jeweiligen Tyrosinreste gesteuert wird.

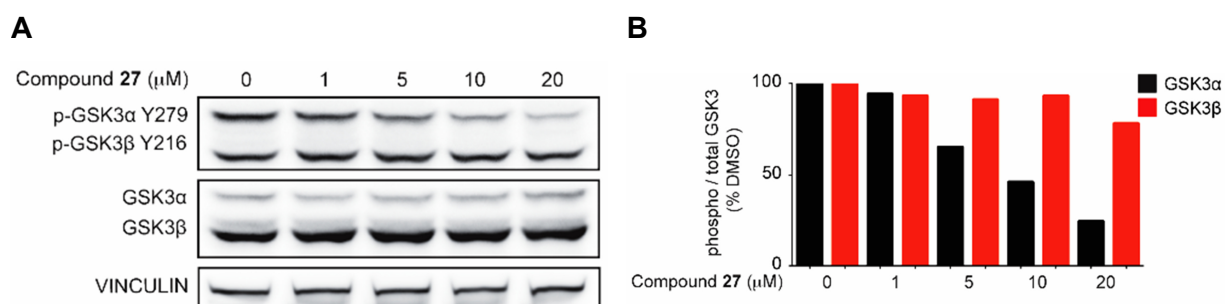


Abbildung 30: Selektive GSK-3 $\alpha$  Inhibition nach 24 h Inkubation der NB4 Zellen bei verschiedenen **BSc5090 (36)**-Konzentrationen (Compound 27 = **BSc5090 (36)**). (A) Western-Blot der lysierten NB4 Zellen mit Antikörpern für p-GSK-3 $\alpha$  Y279, p-GSK-3 $\beta$  Y216, GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ . Als Ladekontrolle diente Vinculin. (B) Verhältnis zwischen p-GSK-3 $\alpha$  Y279 und der gesamten GSK-3 $\alpha$  bzw. p-GSK-3 $\beta$  Y216 und der GSK-3 $\beta$  in Abhängigkeit der steigenden **BSc5090 (36)**-Konzentration. Kopie aus *Neumann et al., J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8907.<sup>[205]</sup> Mit freundlicher Genehmigung von *ACS Publications* [RightsLink® by Copyright Clearance Center].

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenmarker-Expression der Zellen nach 6-tägiger Behandlung mit **BSc5090 (36)** bestimmt. Dabei wurden die NB4- und HL-60-Zellen mit drei unterschiedlichen Fluoreszenz-markierten Antikörpern, welche spezifisch entweder CD11b, CD11c oder CD14 binden, behandelt.

Der Oberflächenmarker CD11b wird vor allem auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert. Das gleiche gilt für CD11c, zusätzlich ist dieser auf Makrophagen zu finden. CD11b und CD11c sind auf Zellen des peripheren Blutes stärker exprimiert als auf Zellen des Knochenmarks.<sup>[26, 319]</sup> CD14 ist auch unter dem englischen Namen *Monocyte Differentiation Antigen* bekannt. Der Name beschreibt exakt dessen Vorkommen. CD14 wird entsprechend vor allem von Monozyten und Makrophagen ausgebildet. Daher wird CD14 im hohen Grad auf Zellen des peripheren Blutes gefunden.<sup>[26, 320]</sup>

Leukämische Zellen sind unreife, entartete Blasten ohne terminale Differenzierung. HL-60- und NB4-Zellen weisen folglich eine fehlende bis niedrige Expression der drei Oberflächenmarker auf.<sup>[26]</sup>



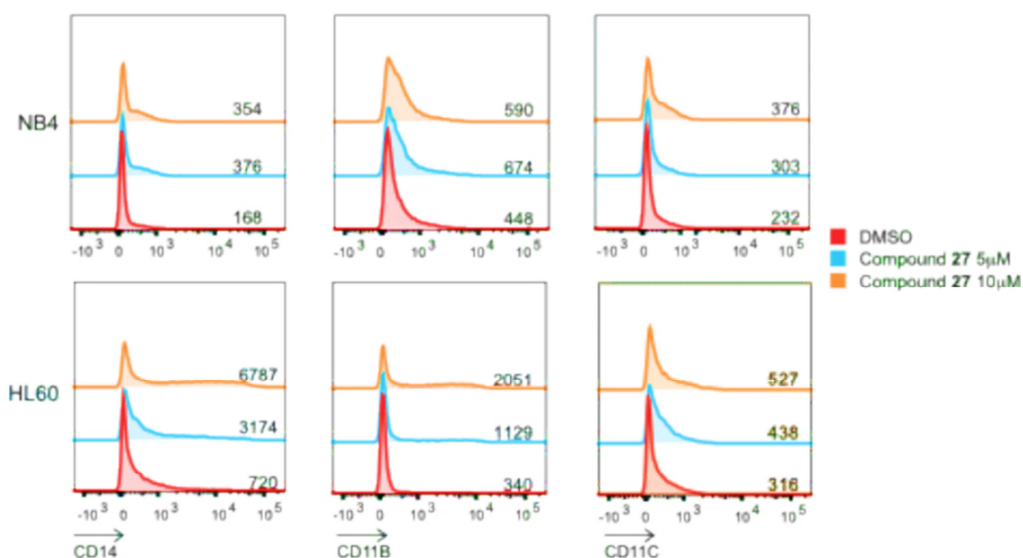


Abbildung 31: *In vitro* Effekt von **BSc5090 (36)** auf die Oberflächenmarker-Expression (CD11b, CD11c und CD14) in AML-Zelllinien (NB4 und HL-60). Pro Oberflächenmarker, **BSc5090 (36)**-Konzentration (Compound 27 = **BSc5090 (36)**) und Zelllinie wurden je 10 000 Zellen in zwei unabhängigen Experimenten analysiert. Die gemittelte Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der Oberflächenmarker. Kopie aus *Neumann et al., J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8907.<sup>[205]</sup> Mit freundlicher Genehmigung von *ACS Publications* [RightsLink® by Copyright Clearance Center].

Allgemein konnte bei der Durchflusszytometrie beobachtet werden, dass die Anzahl an CD11b, CD11c und CD14 bei allen HL-60-Zellen höher ist als bei den NB4-Zellen (Abbildung 31). Dies lässt sich auf die Herkunft der Zellen zurückführen. Viel bedeutender ist, dass die mit **BSc5090 (36)** inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (DMSO) eine deutlich stärkere Expression von CD11b, CD11c und CD14 zeigten. Vor allem bei den HL-60-Zellen war eine beachtliche Steigerung der Expression nach Behandlung der Zellen mit **BSc5090 (36)** zu beobachten. Die verstärkte Expression von CD11b, CD11c und CD14 belegt, dass die NB4- und HL-60-Zellen durch die Behandlung mit **BSc5090 (36)** in Monozyten, Granulozyten und Makrophagen differenziert sind.

Die Beobachtungen der Oberflächenmarker-Expression stimmen auch mit der morphologischen Betrachtung der Zellen überein. Dabei wurde die Morphologie der NB4- und HL-60-Zellen nach 6-tägiger Inkubation mit 5 μM und 10 μM **BSc5090 (36)**-Lösungen im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO mithilfe einer May-Grünwald-Giesma Färbung interpretiert (Abbildung 32A). Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten die NB4 und HL-60 Zellen nach 6-tägiger Behandlung mit **BSc5090 (36)** eine deutliche Veränderung ihrer Morphologie. Bei den Zellen mit **BSc5090 (36)** hat sich das Größenverhältnis zwischen Nukleus und Cytoplasma verringert. Außerdem

veränderte sich die Form der Zellkerne von einer ursprünglich runden Form zu einer bohnenförmigen, gelappten Form. Des Weiteren ließen sich kleine farblose Flecken innerhalb des Cytoplasmas, das sogenannte Granula, sowie innerhalb der Zellkerne, die sogenannten Vakulen, entdecken. Besonders beeindruckend waren die erkennbaren Makrophagen, welche durch die Behandlung der NB4-Zellen mit 10  $\mu$ M **BSc5090 (36)**-Lösung entstanden sind (Abbildung 32 letzte Spalte oben). Sie konnten anhand ihrer Größe und den ausgebildeten langen Fortsätzen (Ärmchen) identifiziert werden. Die morphologischen Veränderungen der Zellen beweisen zusätzlich, dass die NB4- und HL-60-Zellen durch die Behandlung mit **BSc5090 (36)** in Monozyten, Granulozyten und Makrophagen differenziert sind.

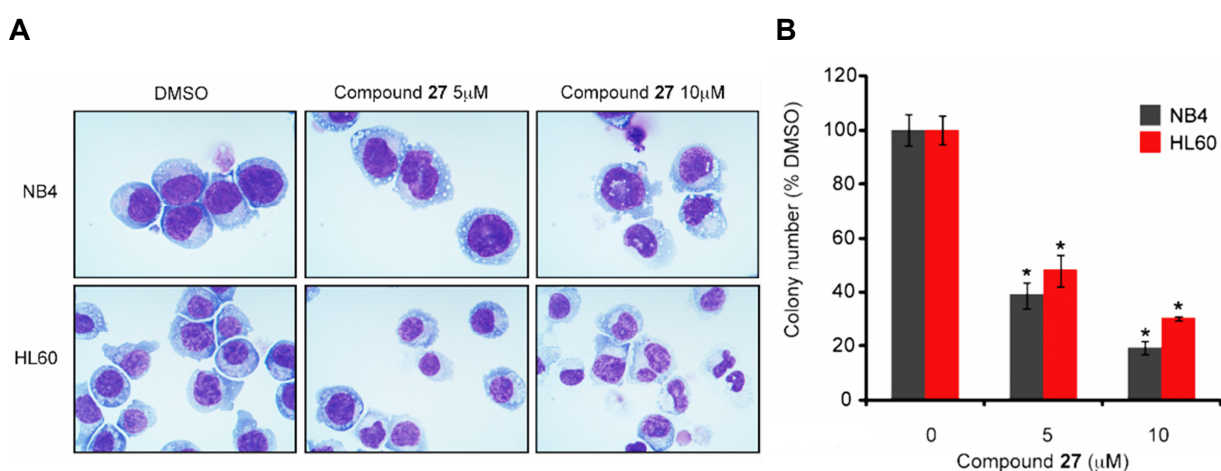



Abbildung 32: (A) Morphologische Veränderungen der AML-Zelllinien (NB4 und HL-60) nach 6-tägiger Behandlung mit **BSc5090 (36)** (Compound 27 = **BSc5090 (36)**) beweisen die Differenzierung der Zellen. (B) Konzentrationsabhängige Abnahme der Kolonienbildung der NB4- (schwarz) und HL-60-Zellen (rot) in Methylcellulose. (\*)  $p < 0.05$  relativ zu DMSO. Fehlerbalken entsprechen dem gemittelten  $\pm$  SEM. Kopie aus Neumann et al., *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 8907.<sup>[205]</sup> Mit freundlicher Genehmigung von ACS Publications [RightsLink® by Copyright Clearance Center].

Zuletzt wurde die Kolonienbildung der AML-Zellen in Methylcellulose untersucht (Abbildung 32B). Hierfür wurden die NB4- und HL-60-Zellen mit 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M **BSc5090 (36)**-Lösung sowie DMSO als Kontrolle vorbehandelt und anschließend auf Methylcellulose gegeben. Nach 7-10 Tagen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Anzahl der NB4- und HL-60-Kolonien. Die Kolonienbildung kann als Parameter für die Proliferationsfähigkeit der Zellen gewertet werden. Ist die Anzahl der Kolonien groß, liegt ein hohes Proliferationspotential vor. Die Abnahme der Kolonienzahl zeigte somit eine Verminderung der ungehemmten Vermehrung der AML-Zellen. Folglich unterstützt dies wiederum die Beobachtung der Differenzierung der unreifen, entarteten AML-Zellen zu ausgereiften Blutzellen.



---

Die beobachtete Wirkung der  $\alpha$ -selektiven Inhibition auf die AML-Zelllinien bestätigt die GSK-3 $\alpha$  als therapeutisches *Target* der AML. Infolgedessen wird dem  $\alpha$ -selektiven Inhibitor **BSc5090 (36)** ein großes Potential für die Behandlung der AML zugeschrieben.

## 3.2 Isoform-spezifische GSK-3-Inhibitoren mit löslichkeitsvermittelnden Gruppen

Eine gängige Methode zur Verbesserung der Löslichkeit schwer löslicher Wirkstoffe ist das Anbringen von hydrophilen Gruppen an die Struktur. Die große Herausforderung liegt dabei jedoch darin, die chemische Struktur des Wirkstoffs zu modifizieren ohne die biologische Aktivität zu dezimieren. Durch das Einführen von hydrophilen, löslichkeitsvermittelnden Gruppen in die Struktur von **BSc4676 (33)** sollte dessen Wasser-Löslichkeit erhöht werden.

### 3.2.1 *In silico* Design für das Anbringen von löslichkeitsvermittelnden Gruppen

In Anlehnung an ATP-kompetitive GSK-3 $\beta$  Inhibitoren von *AstraZeneca*<sup>[233]</sup> sollte durch Sulfonamid-Linker die Wasser-Löslichkeit von **BSc4676 (33)** gesteigert werden. Dabei wurde das Grundgerüst von **BSc4676 (33)** weitestgehend beibehalten, um damit die Aktivität und  $\alpha$ -Selektivität zu erhalten. An der *meta*-Position des endständigen Phenyl-Rings sollten Sulfonamid-verbrückt entweder verschiedene gesättigte Heterozyklen, wie beispielsweise Morpholin oder Piperazin, oder Stickstoff und Sauerstoff enthaltene Kohlenstoffketten eingeführt werden (Abbildung 33). Die *ortho*-Nitril- und die *para*-Fluor-Gruppe werden vorerst aus sterischen und synthetischen Gründen beseitigt.

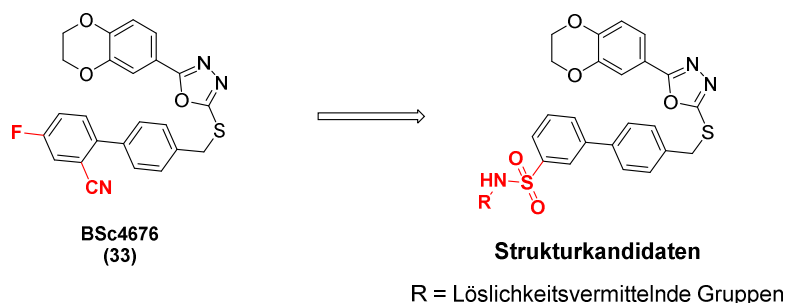


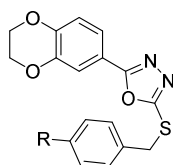
Abbildung 33: Geplante Modifikation von **BSc4676 (33)** durch Anbringen von löslichkeitsvermittelnden Gruppen.

Die vielversprechendsten Strukturkandidaten wurden mittels molekularem Docking ausgewählt. Dafür wurde ein Pharmakophor-basiertes Docking der zuvor entworfenen Liganden in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  durchgeführt. Insgesamt wurden 24 Strukturen gescreent. Pro Struktur wurden 1000 Konformationen mithilfe des Pharmakophormodells in die ATP-Bindungstasche platziert und mit der *London dG* Funktion die 30 besten Konformationen ausgewählt. Anschließend wurden diese

Positionen erneut mit der wissensbasierten  $DSX^{CSD}$ -Funktion bewertet, um die günstigste Konformation zu erhalten.

Für die Beurteilung der besten Strukturkandidaten wurde die von der Molekülgröße unabhängige LE betrachtet (LE siehe Gleichung I, Abschnitt 3.1.2). In Tabelle 21 ist eine Auswahl der besten Strukturkandidaten, sortiert nach absteigender LE, dargestellt.

Tabelle 21: Übersicht der aussichtsreichsten Derivatisierungsmöglichkeiten von **BSc4676 (33)**.



Verbindung	R	DSX-Score	Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome ( <i>a_heavy</i> )	Liganden-Effizienz (LE)	ClogP <sup>a</sup>
60		-193.90	37	-5.24	3.99
61		-193.99	38	-5.11	4.73
63		-185.35	38	-4.88	4.90
64		-180.08	39	-4.62	4.20
65		-175.20	40	-4.38	3.20
66		-164.68	38	-4.33	4.17

<sup>a</sup> Berechnet mit *ChemBioDraw Ultra* (version 13.0.2).<sup>[294]</sup>

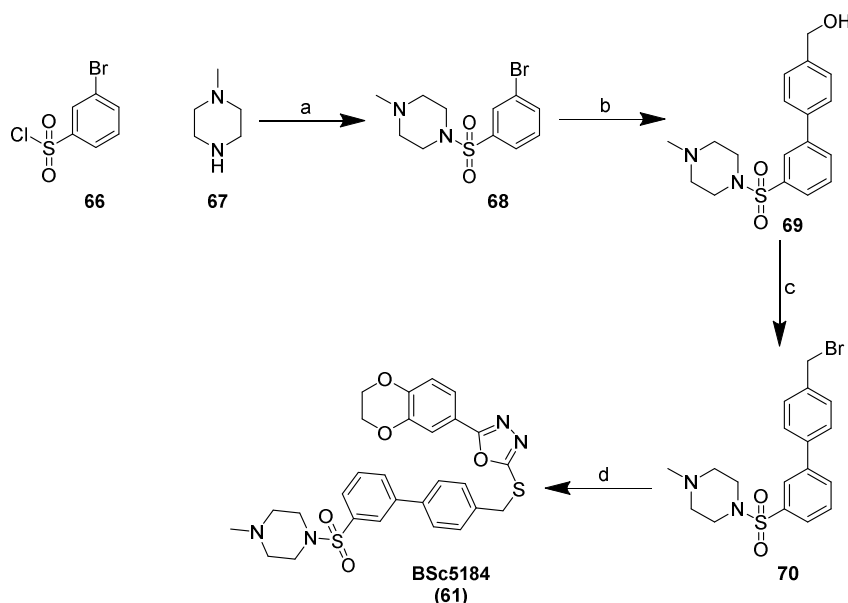
Die besten Kandidaten stellen **60** und **61** dar. Anhand des molekularen Dockings wird jedoch prognostiziert, dass die Seitenketten aus der ATP-Bindungstasche heraus in das umgebende Lösungsmittel ragen und somit nicht zu der Interaktion mit der GSK-3 $\beta$



Aufgrund der identisch vorhergesagten Wechselwirkungen zwischen den Liganden und der GSK-3 $\beta$  wird für **60** und **61** eine ähnliche biologische Aktivität gegenüber der GSK-3 $\beta$  erwartet. Mithilfe des Dockings konnte daher keine Auswahl für einen ersten Synthesekandidaten getroffen werden. Bedingt durch die Verfügbarkeit der benötigten Edukte für **61** sollte zunächst **61** synthetisiert und auf seine biologische Aktivität gegenüber GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  getestet werden. Somit sollte das Konzept zunächst geprüft und anschließend entsprechend der Ergebnisse der biologischen Aktivität von **61** entschieden werden, ob weitere Strukturkandidaten wie beispielsweise **60** synthetisiert werden sollen.

### 3.2.2 Synthese von **61**

Die Darstellung von **61** erfolgte analog der Synthese der zuvor beschriebenen GSK-3-Inhibitoren. **61** unterscheidet sich zu **BSc4676 (33)** durch eine Sulfonamid-verbrückte Seitenkette in *meta*-Position des entstehenden Phenyl-Rings. Diese Sulfonamid-Seitenkette wurde im ersten Syntheseschritt aufgebaut. Dabei wurde das Sulfonylchlorid **66** über eine nukleophile Substitution mit 1-Methylpiperazin (**67**) zum Sulfonamid **68** in einer sehr guten Ausbeute von 94% umgesetzt (Schema 16).



Schema 16: Darstellung von **61**: Reagenzien und Bedingungen: (a) THF, 0°C – RT, 2.5 h, 94%. (b) **47**, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 2 N aq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Toluol/EtOH 1:1, 80°C, 2 d, 87%. (c) PBr<sub>3</sub>, Toluol, 110°C, 3 h, Rohprodukt 33%. (d) **39**, 4 N aq NaOH, DMF, RT, 6 h, 13%.

Anschließend wurde das Sulfonamid **68** mit der 4-(Hydroxymethyl)phenylboronsäure (**47**) unter Suzuki-Bedingungen zu dem gewünschten

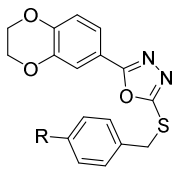
Biphenyl **69** in einer Ausbeute von 87% verknüpft. Die Hydroxy-Gruppe von **69** wurde in Anwesenheit von Phosphortribromid durch Brom substituiert. Das erhaltene benzyliche Bromid **70** wurde ohne weitere Reinigung als Rohprodukt im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt. Im letzten Syntheseschritt erfolgte die Verknüpfung des monobromierten Biphenyls **70** mit dem in Abschnitt 3.1.3 hergestellten Oxadiazol-Bausteins **39** unter basischen Bedingungen. Im Unterschied zu der Synthese von **BSc4676 (33)** musste Kaliumcarbonat anstelle der zu stark basischen 4N NaOH-Lösung eingesetzt werden. Die gewünschte Zielstruktur **61** wurde mit einer sehr niedrigen Ausbeute von 11% erhalten. Die Verwendung einer nicht nukleophilen Base, wie z.B. DIPEA, könnte die Ausbeute in diesem Schritt eventuell steigern, da dabei die Sulfonamid-Gruppe von der Base vermutlich überhaupt nicht oder weniger stark angegriffen werden würde.

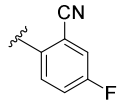
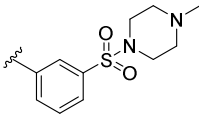


### 3.2.3 Biologische Aktivität von BSc5184 (61) gegenüber der GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$

Die Aktivität von **BSc5184 (61)** gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  wurde von dem Dienstleistungsunternehmen *Cerep* gemessen (siehe Abschnitt 5.6.1). Als Messergebnisse sind die %-Inhibitionen von **BSc5184 (61)** gegenüber der spezifischen Kontrollaktivität von Staurosporin (siehe Abschnitt 3.1.4) bei einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu$ M angegeben. In Tabelle 22 sind die jeweiligen %-Inhibitionen von **BSc5184 (61)** sowie von **BSc4676 (33)** zum Vergleich angegeben.

Tabelle 22: Inhibitorische Aktivität von **BSc5184 (61)** gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  im Vergleich zu **BSc4676 (33)**.



Verbindung	R	GSK-3 $\alpha$ %-Inhibition	GSK-3 $\beta$ %-Inhibition
		bei 1 $\mu$ M der Testsubstanz	
<b>BSc4676 (33)</b>		80	45
<b>BSc5184 (61)</b>		57	49

**BSc5184 (61)** besitzt im Vergleich zu **BSc4676 (33)** eine deutlich schwächere Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$ . **BSc5184 (61)** inhibiert beide Isoformen mit einer %-Inhibition von 57% gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und 49% gegenüber der GSK-3 $\beta$  ungefähr gleich stark. Entgegen der Vermutung einer  $\alpha$ -Selektivität, bedingt durch die Wechselwirkung zu Arg141 (Abbildung 34C/D), liegt bei **BSc5184 (61)** keine Selektivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  mehr vor. Aufgrund der fehlenden  $\alpha$ -Selektivität von **BSc5184 (61)** wurde das Projekt eingestellt und keine Löslichkeitsmessungen durchgeführt. Folglich wurden auch keine weiteren Strukturen synthetisiert.

### 3.2.4 Zusammenfassung und Ausblick: Isoform-spezifische GSK-3-Inhibitoren mit Löslichkeitsvermittelnden Gruppen

Im Rahmen dieses Projektes wurde basierend auf der Struktur von **BSc4676 (33)** eine Reihe an Strukturkandidaten mit Sulfonamid-verbrückten, löslichkeitsvermittelnden Seitenketten entworfen. Anschließend konnte **BSc5184 (61)** als erster Testkandidat erfolgreich synthetisiert und *in vitro* auf seine Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  getestet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass **BSc5184 (61)** beide Isoformen ähnlich stark, jedoch schlechter als die Leitstruktur **BSc4676 (33)**, inhibiert. Die ausgezeichnete  $\alpha$ -Selektivität von **BSc4676 (33)** fehlt bei **BSc5184 (61)**. Folglich wurde das Projekt nicht weiter verfolgt.

In Abschnitt 3.1.5 wird angenommen, dass vor allem der *para*-Substituent der biphenylischen Endgruppe der **BSc4676 (33)**-ähnlichen GSK-3-Inhibitoren für die  $\alpha$ -Selektivität verantwortlich ist. Durch die Einführung der *para*-Fluor-Gruppe in die Struktur von **BSc5184 (61)** könnte eventuell die  $\alpha$ -Selektivität wieder hergestellt werden (Abbildung 35A). Das Protein/-Liganden-Docking des Strukturkandidaten **71** prognostiziert, dass sich der Sulfonamid-Linker dreht und über ein Sauerstoffatom des Sulfons eine Wechselwirkung zu Arg144 ausgebildet wird (Abbildung 35B), die für die  $\alpha$ -Selektivität der Oxadiazol-Derivate, wie beispielsweise **BSc5132 (34d)**, verantwortlich gemacht wird (siehe Abschnitt 3.1.5).

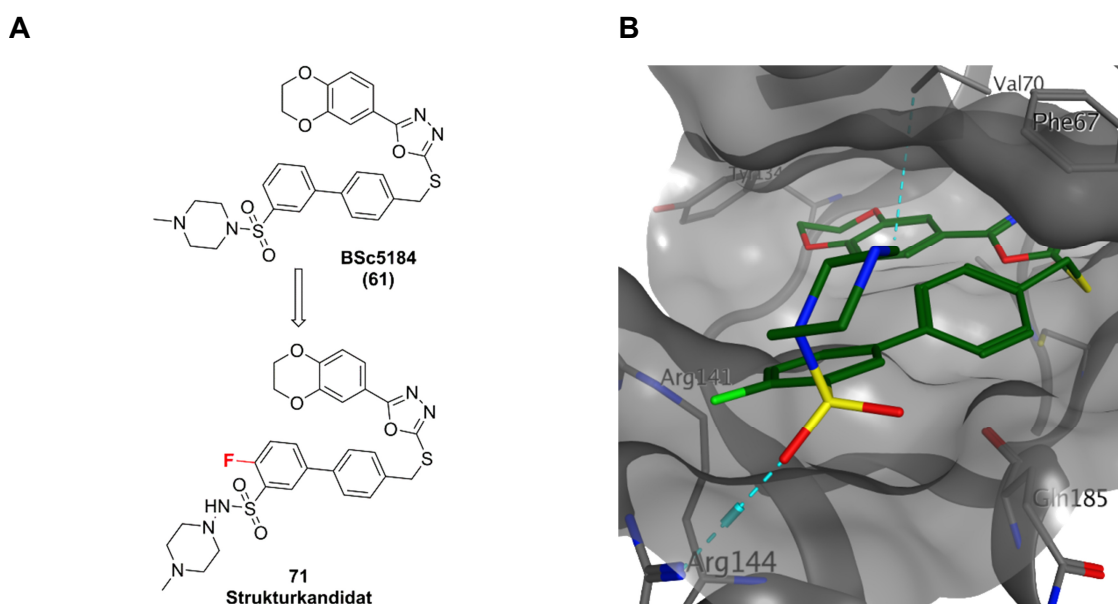


Abbildung 35: (A) Potentielle Strukturverbesserung von **BSc5184 (61)**. (B) Protein/Liganden-Docking des Strukturkandidaten **71** in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88). Verwendete Software: *MOE 2014.0901*.

### 3.3 Duale Inhibition der GSK-3 und der *h*QC als neuer Therapieansatz für die AD

Die histopathologischen Merkmale der AD sind die extrazellulären amyloiden Plaques und die intrazellulären Neurofibrillenbündel. Die genauen Zusammenhänge zwischen beiden Pathologien sowie die molekularen Mechanismen, welche die AD auslösen sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Hyperphosphoryliertes Tau und pGlu-modifizierte A $\beta$ -Peptide werden derzeit als mögliche Verursacher der AD stark favorisiert. Mit einem *dual-targeting* Ansatz sollte daher die Entstehung von hyperphosphoryliertem Tau und pGlu-A $\beta$ -Peptiden verhindert werden.

Dabei sollte mit einem einzigen Inhibitor zum einen die GSK-3, welche für die Hyperphosphorylierung von Tau verantwortlich gemacht wird, und zum anderen die *h*QC, welche die Zyklisierung des freien Glu3 von A $\beta$ -Peptiden zum Pyroglutamat katalysiert, gehemmt werden.

#### 3.3.1 Entwurf eines potentiell dual-selektiven Inhibitors der GSK-3 und der *h*QC

Mit einem einzigen Inhibitor sollte die GSK-3 und die *h*QC gehemmt werden. Daher sollte der neue Inhibitor Strukturelemente in sich vereinen, welche sich bereits bei bekannten, Enzym-spezifischen Inhibitoren bewährt hatten.

Für kompetitive Inhibitoren der *h*QC ist das Zn<sup>2+</sup>-Ion innerhalb des aktiven Zentrums der *h*QC die wichtigste Interaktionsstelle. Folglich besitzen bekannte Inhibitoren der *h*QC metallkomplexierende Strukturelemente, wie beispielsweise Imidazole und Benzimidazole.<sup>[256, 321-322]</sup> Buchholz *et al.* entwickelten eine Reihe an Benzimidazol-Oxadiazolen und -Thiadiazolen, welche die höchsten bisher bekannten Aktivitäten gegenüber der *h*QC aufweisen.<sup>[256]</sup> Die Inhibitionskonstanten der Derivate gegenüber der *h*QC liegen im nanomolaren Bereich. Das Benzimidazol-Thiadiazol **72** ist mit einer Inhibitionskonstante von 23 nM der potenteste Inhibitor dieser Reihe (Abbildung 36). Zu den aktivsten und selektivsten Inhibitoren der GSK-3 zählt **BSc4676 (33)** (siehe Abschnitt 3.1.1).

Für den potentiellen dual-selektiven Inhibitor beider Enzyme wurden die wichtigsten Strukturelemente von **72** und **BSc4676 (33)** in einer Struktur zusammengefügt. Dabei wurde von dem *h*QC-Inhibitor **72** der Benzimidazol-Ring (Abbildung 36, rot) und von dem GSK-3-Inhibitor **BSc4676 (33)** der Oxadiazol-Ring und die biphenylische Endgruppe (Abbildung 36, rot) verwendet. Die Kombination der Strukturmodule ergab den potentiellen dual-selektiven Inhibitor **73**.

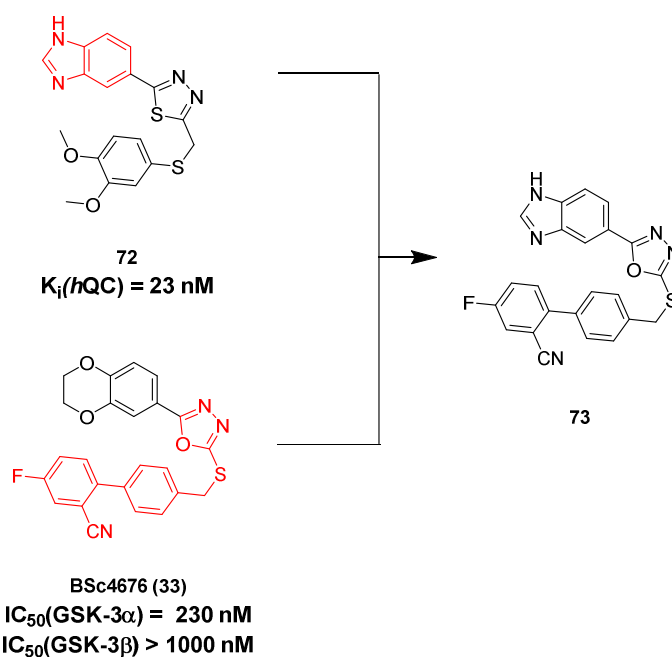


Abbildung 36: Entwurf eines potentiell dual-selektiven Inhibitors **73** aus der Kombination des *hQC*-Inhibitors **72** und des GSK-3-Inhibitors **BSc4676 (33)**.

Mithilfe des computergestützten Protein/Liganden-Docking wurde die Strukturidee auf Plausibilität überprüft, indem mögliche Wechselwirkungen des entworfenen Inhibitors **73** mit den aktiven Zentren beider Enzyme vorhergesagt wurden. Damit sollte das Potential von **73** für eine duale Inhibition abgeschätzt werden.

Da bisher nicht gesagt werden kann, welche tautomere Form des Benimidazol-Rings bevorzugt gebunden wird, wurden beide Tautomere von **73** mit beiden Enzymen gedockt. Das Docking der Tautomere von **73** in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  erfolgte analog des Dockings der Oxadiazol-Derivate in Abschnitt 3.1.2. Die durch die DSX<sup>CSD</sup>-Funktion am besten bewertete Konformation von **73** ist in Abbildung 37 dargestellt. Entsprechend des Protein/Liganden-Dockings bindet die GSK-3 $\beta$  bevorzugt das 5-yl Tautomer von **BSc5136 (73)**. Die Benzimidazol- und Oxadiazol-Gruppen sind in Richtung der Gelenk-Region gerichtet. Der Oxadiazol-Ring liegt zwischen Val70 und Cys199. Für den Oxadiazol-Ring wird eine H- $\pi$ -Wechselwirkung mit Val70 und über ein Stickstoffatom eine Wasserstoffbrücke mit Lys85 vorhergesagt. Der innere Ring der biphenylischen Endgruppe interagiert mit Gln185 über eine H- $\pi$ -Wechselwirkung.

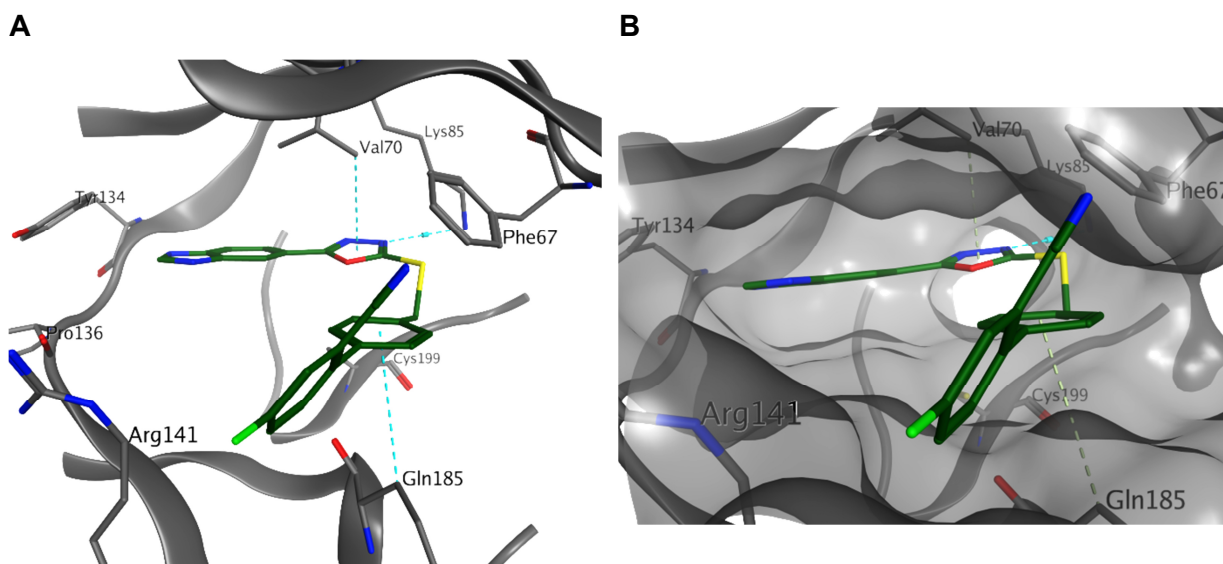


Abbildung 37: Protein/Liganden-Docking von **73** in die ATP-Bindungstasche der GSK-3β (PDB Code 3F88). Verwendete Software: *MOE 2014.0901*.

Im weiteren Verlauf sollten auch mögliche Wechselwirkungen von **73** mit der *hQC* prognostiziert werden. Für das Protein/Liganden-Docking wurde die Röntgenkristallstruktur (PDB Code 3si0) der *hQC* verwendet, welche Imidazol als kokristallisierten Inhibitor enthält. Ausgehend von der vorliegenden Kokristallstruktur wurde ein strukturbasiertes Pharmakophormodell erstellt. Dieses umfasst zwei Deskriptoren. Der erste Deskriptor ist ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor, welcher durch das Stickstoffatom des Imidazol-Rings gebildet wird (Abbildung 38A, hellblaue Kugel). Der zweite Deskriptor wird durch das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion dargestellt (Abbildung 38A, gelbe Kugel).

Anschließend wurde ein Pharmakophor-basiertes Docking der beiden Tautomere von **73** in das aktive Zentrum der *hQC* durchgeführt. Das Docking erfolgte in Anlehnung an das in Abschnitt 3.1.2 beschriebene Docking mit *Amber12:EHT* als Kraftfeld und *London dG* sowie darauffolgenden *DSX<sup>CSD</sup>* als Scoring-Funktionen. Die am besten bewertete Konformation von **73** in der *hQC* ist in Abbildung 38B-D dargestellt.

Das Protein/Liganden-Docking sagt bei der *hQC* ebenfalls einen Vorteil für das 5-yl-substituierte Tautomer von **73** voraus. Das Docking von **73** prognostiziert Wechselwirkungen mit den katalytisch wichtigen Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums der *hQC* (Abbildung 38B). Beide Ringe der Benzimidazol-Gruppe interagieren über H- $\pi$ -Wechselwirkungen mit Trp329. Außerdem bildet die NH-Gruppe des Benzimidazols eine Wasserstoffbrücke mit Asp248. Das aktive

Zentrum der *h*QC ist relativ klein, sodass die biphenylische Endgruppe von **BSc5136** (**73**) aus der Tasche in das umgebene Lösungsmittel ragt (Abbildung 38D).

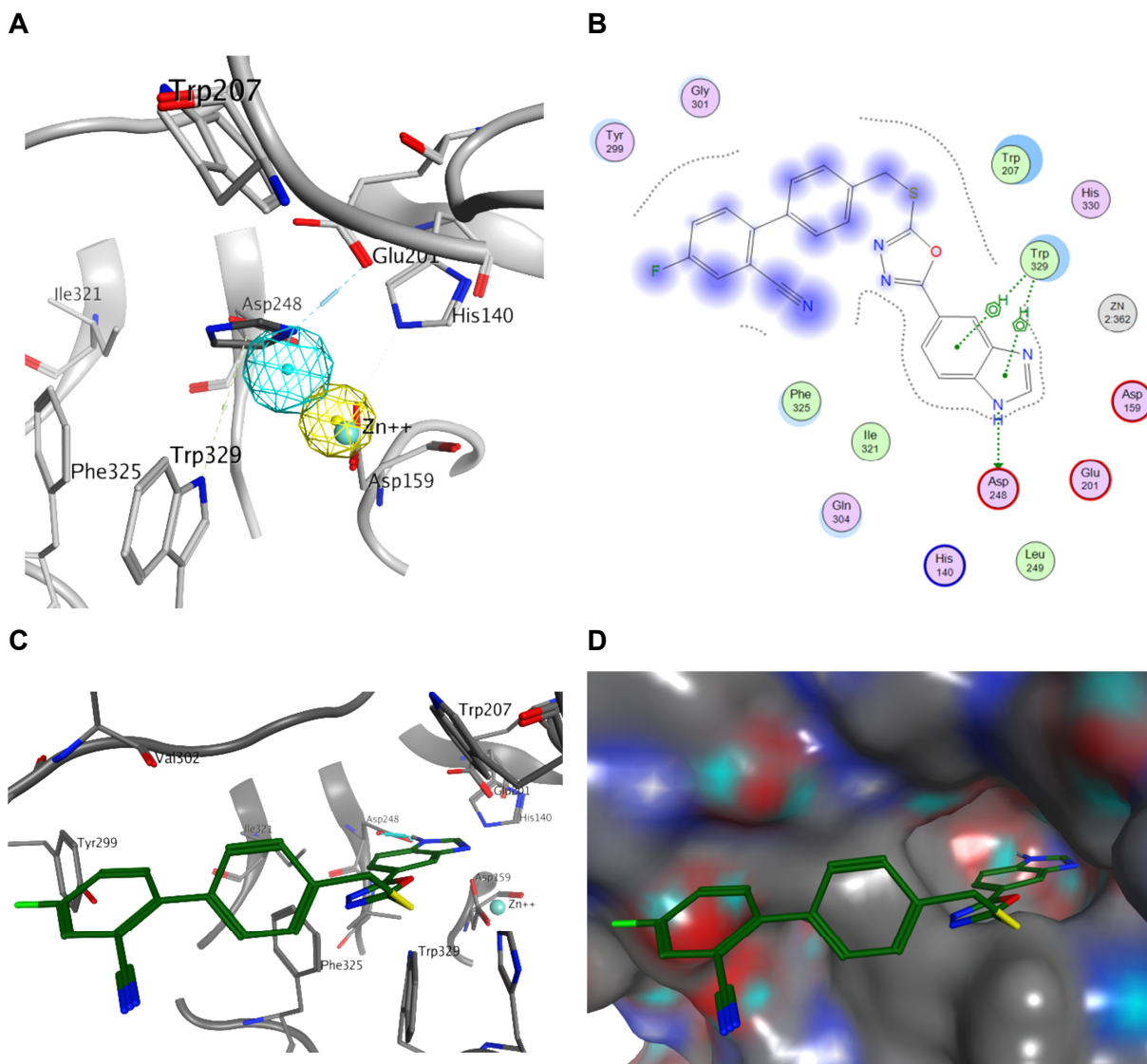
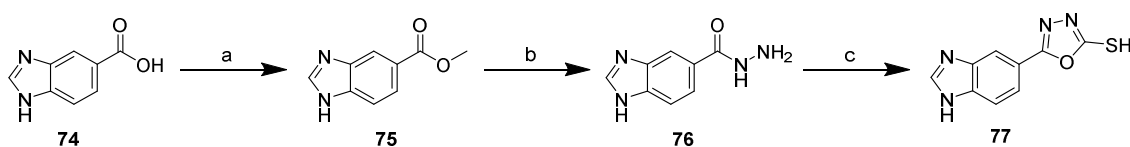


Abbildung 38: (A) Pharmakophormodell basierend auf der Kokristallstruktur von Imidazol und *h*QC (PDB Code 3si0). Das Pharmakophormodell wird dargestellt durch einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor (hellblaue Kugel) und dem  $Zn^{2+}$ -Ion (gelbe Kugel). (B) 2-Dimensionale Liganden-Protein-Interaktionskarte der besten Konformation von **73** im aktiven Zentrum der *h*QC. (C) und (D) Durch Protein/Liganden-Docking resultierende beste Bindungsgeometrie von **73** in der *h*QC. Verwendete Software: *MOE 2014.0901*.

Die durch das Protein/Liganden-Docking vorhergesagten Wechselwirkungen zwischen **BSc5136** (**73**) und der GSK-3 $\beta$  sowie der *h*QC lassen eine hohe inhibitorische Aktivität von **BSc5136** (**73**) gegenüber den beiden Enzymen vermuten. Folglich scheint eine duale Inhibition der GSK-3 $\beta$  sowie der *h*QC mit **BSc5136** (**73**) plausibel zu sein. Im folgenden Verlauf sollte daher **BSc5136** (**73**) synthetisiert und auf seine biologische Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$ , der GSK-3 $\beta$  und der *h*QC evaluiert werden.

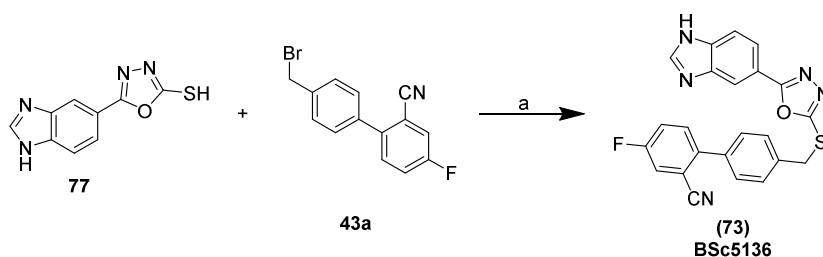
### 3.3.2 Synthese von 73

Die Darstellung von **73** erfolgte analog der Synthese der zuvor beschriebenen GSK-3-Inhibitoren aus Abschnitt 3.1.3. **73** unterscheidet sich zu **BSc4676 (33)** durch eine Benzimidazol-Kopfgruppe. Die Synthese des Benzimidazol-Bausteins **77** erfolgte über 3 Syntheseschritte (Schema 17). Im ersten Schritt wurde die Benzimidazolsäure **74** mit Thionylchlorid und MeOH zum Methoxyester **75** in einer sehr guten Ausbeute von 95% verestert. Anschließend wurde **75** zum Hydrazid **76** umgesetzt, welches ohne Reinigung in der nächsten Stufe weiter eingesetzt wurde. Das Oxadiazol-Derivat **77** wurde schließlich durch die Zyklisierung des Hydrazids **76** mit Kohlenstoffdisulfid in einer geringen Ausbeute von 11% erhalten.



Schema 17: Darstellung des Benzimidazol-Bausteins **77**. Reagenzien und Bedingungen: (a)  $\text{SOCl}_2$ , MeOH, 0-50°C, 16 h, 95%; (b)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, 75°C, 2 d, Rohprodukt; (c)  $\text{CS}_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , EtOH, 75°C, 2 d, 11%.

Die Synthese des monobromierten Biphenyl-Derivats **43a** wurde bereits in Abschnitt 3.1.3 beschrieben. Für die Darstellung der Zielstruktur **73** wurde **43a** mit dem Benzimidazol-Baustein **77** unter stark basischen Bedingungen verknüpft (Schema 9). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt **73** mit einer Ausbeuten von 13% erhalten werden.



Schema 18: Darstellung von **73**: Reagenzien und Bedingungen: (a) 4 N aq NaOH, DMF, RT, 6 h, 13%.



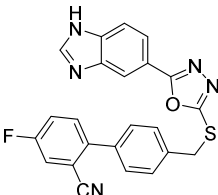
### 3.3.3 Biologische Aktivität von BSc5136 (73) gegenüber der hQC und der GSK-3 $\alpha/\beta$

Die Aktivität von **BSc5136 (73)** gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  wurde von dem Dienstleistungsunternehmen *Cerep* gemessen (siehe Abschnitt 5.6.1). Als Messergebnisse sind die %-Inhibitionen von **BSc5136 (73)** gegenüber der spezifischen Kontrollaktivität von Staurosporin (siehe Abschnitt 3.1.4) angegeben.

Für die Aktivität von **BSc5136 (73)** gegenüber der hQC wurde die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) in der Arbeitsgruppe von *Schilling* am *Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI* in Halle bestimmt (siehe Abschnitt 5.6.3).

In Tabelle 23 sind die inhibitorischen Aktivitäten von **BSc5136 (73)** gegenüber den drei Enzymen zusammengefasst.

Tabelle 23: Aktivität von **BSc5136 (73)** gegenüber der GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$  und hQC.

Verbindung	Struktur	GSK-3 $\alpha$	GSK-3 $\beta$	$K_i$ hQC [ $\mu$ M]
		%-Inhibition	%-Inhibition	
		bei 1 $\mu$ M der Testsubstanz		
BSc5136 (73)		36	0	$1.95 \pm 0.15$

**BSc5136 (73)** zeigt nur eine schwach hemmende Wirkung gegenüber der GSK-3 $\alpha$ . Darüberhinaus wird die GSK-3 $\beta$  bei der Testkonzentration von 1  $\mu$ M von der **BSc5136 (73)** überhaupt nicht inhibiert. Mit einer %-Inhibition von 36% gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und 0% gegenüber der GSK-3 $\beta$  besitzt **BSc5136 (73)** eine leichte  $\alpha$ -Selektivität.

**BSc5136 (73)** weist gegenüber der hQC eine Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich auf. Mit einer Inhibitionskonstante von 1.95  $\mu$ M wirkt **BSc5136 (73)** jedoch schwächer inhibierend als die bereits bekannten Inhibitoren von *Buchholz*,<sup>[256]</sup> deren Inhibitionskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich liegen.



### 3.3.4 Zusammenfassung und Ausblick: Duale Inhibition der GSK-3 und der hQC

Im Rahmen dieses Projektes wurde ein dual-selektiver Inhibitor **BSc5136 (73)** für die GSK-3 und die hQC entworfen. **BSc5136 (73)** vereint die Struktur motive des hQC-Inhibitors **72** und des GSK-3-Inhibitors **BSc4676 (33)** in einer neuen Struktur. Durch das Docking von **BSc5136 (73)** in das aktive Zentrum der GSK-3 $\beta$  und der hQC konnte die Umsetzbarkeit einer dualen Inhibition der Enzyme durch **BSc5136 (73)** bekräftigt werden. Anschließend konnte **BSc5136 (73)** erfolgreich synthetisiert werden und *in vitro* auf seine hemmende Wirkung untersucht werden. Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung zeigen, dass **BSc5136 (73)** die GSK-3 $\alpha$  und die hQC inhibiert. Dennoch ist die inhibitorische Aktivität von **BSc5136 (73)** gegenüber den beiden Enzymen noch sehr schwach und muss weiter optimiert werden.

Die Struktur von **BSc5136 (73)** kann auf vielfältige Weise weiter verändert und optimiert werden. Dabei sollte gleichzeitig die Aktivität gegenüber der hQC und der GSK-3 gesteigert werden.

Buchholz *et al.*<sup>[256]</sup> zeigten, dass durch den Wechsel des Oxadiazol- zum Thiadiazol-Ring die hemmende Wirkung der Inhibitoren gegenüber der hQC erheblich gesteigert werden konnte. Daher wäre der Austausch des Oxadiazol-Rings von **BSc5136 (73)** zum Thiazol-Ring in **78** zu erwägen (Abbildung 39).

Für die Steigerung der Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha/\beta$  könnte in Anlehnung an diese Arbeit vorgegangen werden. In Abschnitt 3.1.4 konnte die inhibitorische Wirkung der GSK-3-Inhibitoren durch Modifikation der biphenylischen Endgruppe erhöht werden. Für eine Verbesserung von **BSc5136 (73)** könnte z.B. die biphenylischen Endgruppe von **BSc5132 (34d)** übernommen werden.

Unter Beachtung beider Verbesserungsstrategien sind folgende Strukturkandidaten **78-80** als potentielle dual-selektive Inhibitoren denkbar.

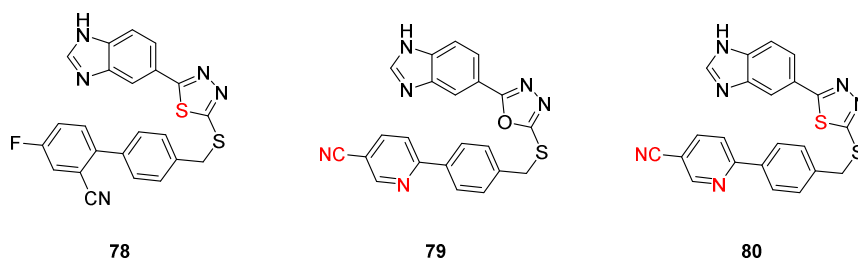


Abbildung 39: Potentielle dual-selektive Inhibitorkandidaten der GSK-3 und der hQC.

### 3.4 Liganden-basierte Leitstrukturentwicklung für neue GSK-3-Inhibitoren

Die gezielte Entwicklung von niedermolekularen Molekülen als neue Wirkstoffe beginnt in der Regel mit der Identifizierung einer sogenannten Leitstruktur. Hierbei handelt es sich um ein Molekül, welches bereits die gewünschte Wirkung gegenüber dem ausgewählten *Target* zeigt, jedoch im Hinblick auf Aktivität, Selektivität und pharmakokinetische Eigenschaften durch Modifikationen der Molekülstruktur im Laufe der Arzneimittelentwicklung weiter optimiert wird.<sup>[150]</sup>

In der modernen medizinischen Chemie gibt es ein breites Methodenspektrum zur Generierung einer solchen Leitstruktur. Allgemein lassen sich die vorliegenden Verfahren entsprechend ihrer Herangehensweise in das Liganden- und das Struktur-basierte Wirkstoffdesign unterteilen.<sup>[323]</sup>

Die Grundlage für Methoden des Struktur-basierten Wirkstoffdesigns ist die Proteinstruktur des *Targets*, welche zuvor durch Röntgenkristallographie aufgeklärt werden musste. Für das Liganden-basierte Wirkstoffdesign hingegen sind keine genauen Kenntnisse über die Proteinstruktur des *Targets* notwendig. Es handelt sich dabei um einen wissensbasierten Ansatz, bei dem bereits bekannte Wirkstoffmoleküle, wie beispielsweise zugelassene oder klinisch fortgeschrittene Verbindungen, herangezogen werden. Aus der Analyse der bekannten Wirkstoffmoleküle lassen sich gängige Molekülgrundgerüste, welche für die Wirkung gegenüber dem *Target* verantwortlich sind, ableiten. Ausgehend von diesen bevorzugten Fragmenten lassen sich neue Leitstrukturen erstellen.<sup>[323-324]</sup>

Die meisten zur Therapie genehmigten niedermolekularen Kinase-Inhibitoren sind ATP-kompetitive Inhibitoren, welche an die Gelenk-Region, der Adenin-bindenden Region der Kinase binden.<sup>[325-326]</sup> Das Proteinrückgrat der Gelenk-Region der Kinasen hat in der Regel einen Wasserstoffbrückendonator, welcher von zwei Wasserstoffbrückenakzeptoren umgeben ist (Abbildung 40). Die Aminosäuren, welche die Wasserstoffbrückenakzeptoren darstellen, werden entsprechend ihrer Position zur Türsteher-Aminosäure (*gatekeeper*, *gk*) mit *gk*+1 und *gk*+3 bezeichnet.<sup>[324]</sup>

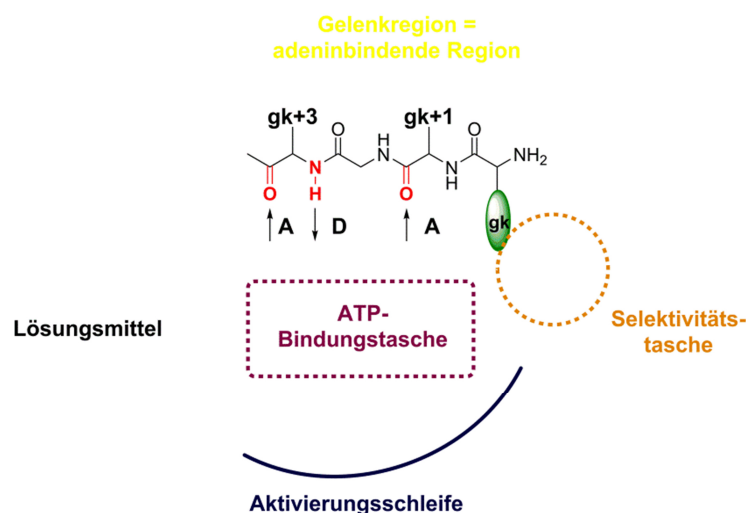


Abbildung 40: Schematische Darstellung der ATP-Bindungstasche. Die Gelenk-Region stellt die adeninbindende Region mit einer Akzeptor (A) - Donor (D) - Akzeptor Reihenfolge. Die Türsteher-Aminosäure (gk) reguliert den Zugang zur Selektivitätstasche. In Anlehnung an *Ghose et al.*<sup>[324]</sup>

Die Adenin-Gruppe **81** des ATPs bindet über die Amino-Gruppe an gk+1 und über das N1-Atom des Purins an den Donor der gk+3 Aminosäure der Gelenk-Region (Abbildung 41). Die interagierenden Fragmente der Wirkstoffmoleküle bilden dabei häufig die gleichen Wechselwirkungen wie die Adenin-Gruppe des ATPs aus (Abbildung 41).<sup>[324]</sup>

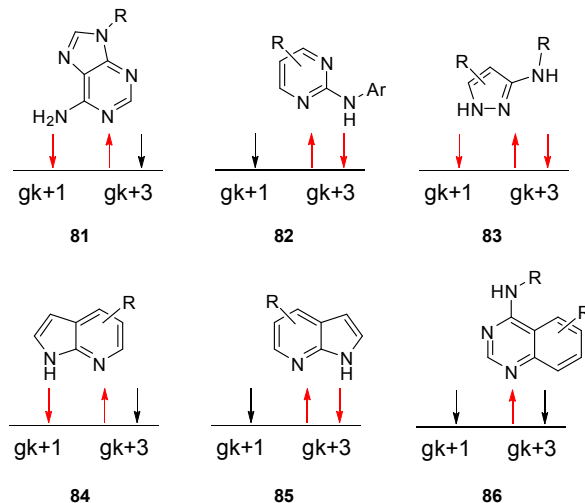


Abbildung 41: Auswahl an bevorzugten Molekülgrundgerüsten für Kinase-Inhibitoren. Die vorliegenden Donor-/Akzeptor-Wechselwirkungen der Strukturelemente mit der Gelenk-Region sind mit roten Pfeilen sowie der Position relativ zur Türsteher-Aminosäure markiert. In Anlehnung an *Ghose et al.*<sup>[324]</sup>

Adenin ist ein Amino-Pyrimidin-Derivat. Daher ist es verständlich, dass innerhalb der zugelassenen Kinase-Inhibitoren sehr häufig das Amino-Pyrimidin-Motiv **82** zu finden ist. Dieses charakteristische Strukturelement **82** ist für die Wechselwirkungen mit der Hinge-Region verantwortlich.<sup>[324]</sup> Bereits der erste zugelassene Kinase-Inhibitor

**Imatinib (88)** sowie viele weitere wie z.B. **Ceritinib (89)** enthalten dieses Bindungsmotiv (Abbildung 42).<sup>[324, 326]</sup>

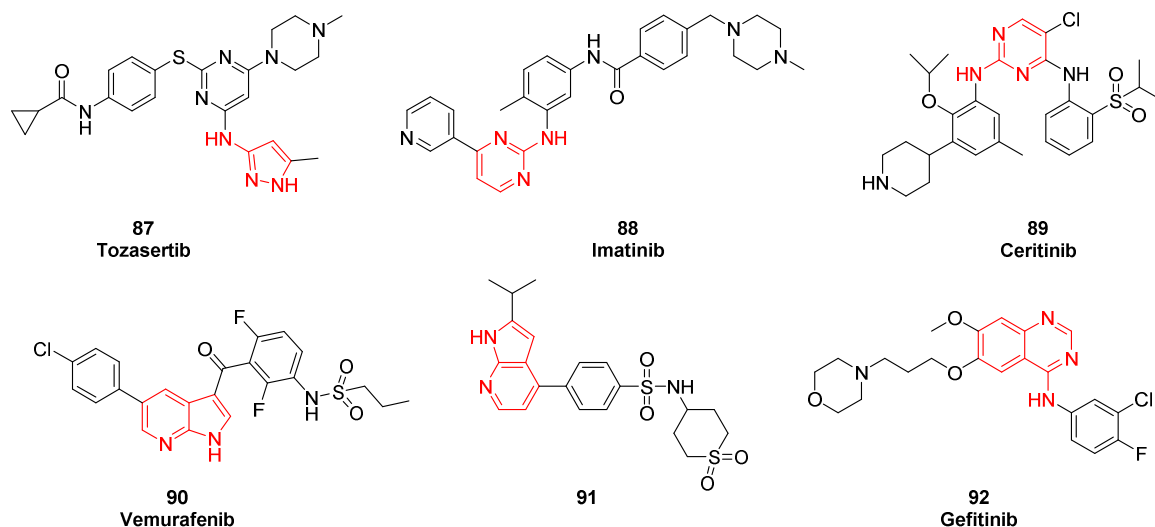


Abbildung 42: Beispiele für Kinase-Inhibitoren mit bevorzugten Grundgerüsten.<sup>[325-328]</sup>

Das Strukturgerüst des Amino-Pyrazols **83** ist zwar in noch keinem der zugelassenen Kinase-Inhibitoren vertreten, jedoch kann dieses über eine Donor-Akzeptor-Donor-Triade sogar drei Wasserstoffbrückenbindungen mit der Gelenk-Region eingehen. Der Aurora Kinase-Inhibitor **Tozasertib (87)** auch bekannt als **VX-680** ist für diesen Bindungsmodus ein erfolgreiches Beispiel.<sup>[327, 329]</sup>

In den beiden Strukturmotiven **84** und **85** ist das 7-Azaindol das wechselwirkende Element. Das 7-Azaindol-Fragment von **84** imitiert die Wasserstoffbrücken-Donor und –Akzeptor Funktionalitäten des Adenins **81** durch die NH-Gruppe des Pyrrol-Rings und das Stickstoff-Atom des Pyridins. Es ist daher nicht erstaunlich, dass dieses Strukturgerüst wiederholt auftritt.<sup>[324, 328]</sup> Als Beispiel kann der zugelassene B-Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*, Raf) Inhibitor **Vemurafenib (90)** genannt werden.<sup>[325-326]</sup> Die meisten Inhibitoren mit einem 7-Azaindol-Motiv binden, wie für **84** beschrieben, mit dem Pyrrol-Ring in Richtung der Türsteher-Aminosäure. Bei ein paar wenigen Kokristallstrukturen, wie z.B. bei **91** in der humanen Jnk1 alpha Kinase (PDB Code 4AWI), zeigt der Pyrrol-Ring jedoch von der Türsteher-Aminosäure weg und interagiert nur mit der gk+3 Aminosäure (**85**). Bei der Entwicklung von Kinase-Inhibitoren sollten daher die beiden Orientierungen **84** und **85** berücksichtigt werden.<sup>[328]</sup>

Das zuletzt betrachtete Grundgerüst ist das Quinazolin-Motiv von **86**. Dabei handelt es sich um ein vielfach validiertes Strukturelement, das in mehreren zugelassenen

Kinase-Inhibitoren, wie beispielsweise **Gefitinib (92)** vorliegt. Das Quinazolingerüst bindet bevorzugt über eine einzelne Wasserstoffbrücke an die Gelenk-Region, wie bei **86** dargestellt.<sup>[324, 326]</sup>

Auf Basis der diskutierten Grundgerüste sollten verschiedene Leitstrukturen entwickelt und auf ihre Eignung als Ausgangspunkt für zukünftige GSK-3-Inhibitoren geprüft werden. Das Ziel war es potente Leitstrukturen für die GSK-3 zu finden, welche in nachfolgenden Arbeiten im Hinblick auf Isoform-Selektivität optimiert werden können.

### 3.4.1 Liganden-basiertes Design neuer Leitstrukturen für potentielle GSK-3-Inhibitoren

Ausgehend von den bereits bekannten Kinase-Inhibitoren **Tozasertib (87)**, **Gefitinib (92)** und **Vemurafenib (90)** wurden drei potentielle Leitstrukturen **93-95** abgeleitet. Die Strukturen enthalten jeweils das mit der Gelenk-Region interagierende Grundgerüst (Abbildung 43, rot markiert).

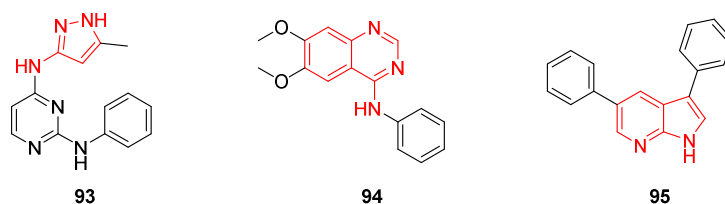


Abbildung 43: Potentielle Leitstrukturen für neue GSK-3-Inhibitoren.

Mithilfe des Computer-gestützten Protein/Liganden-Docking wurden die Strukturideen der neu entworfenen Leitstrukturen **93-95** auf Plausibilität überprüft, indem mögliche Wechselwirkungen mit der ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  prognostiziert wurden. Dabei sollte vor allem untersucht werden, ob die zuvor in Abbildung 41 vorausgesetzten Interaktionen zwischen den Grundgerüsten und der Gelenk-Region der GSK-3 $\beta$  möglich sind.

Für das Protein/Liganden-Docking wurde wiederum die Röntgenkristallstruktur (PDB Code 3F88) der GSK-3 $\beta$  verwendet. Der darin kokristallisierte Inhibitor zeigt eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Imidazol-Ring und der gk+3 Aminosäure Val135 (Abbildung 44A). Diese Wechselwirkung mit der Gelenk-Region wurde für ein strukturbasiertes Pharmakophormodell genutzt. Dabei umfasst das erstellte Pharmakophormodell zum Einen den Deskriptor des Wasserstoffbrückenakzeptors, welcher durch das Stickstoffatom des Imidazol-Rings gebildet wird (Abbildung 44B,

hellblaue Kugel) und zum Anderen einen Deskriptor für den aromatischen Ring, welcher von dem Imidazol-Ring ausgefüllt wird (Abbildung 44B, orange Kugel).

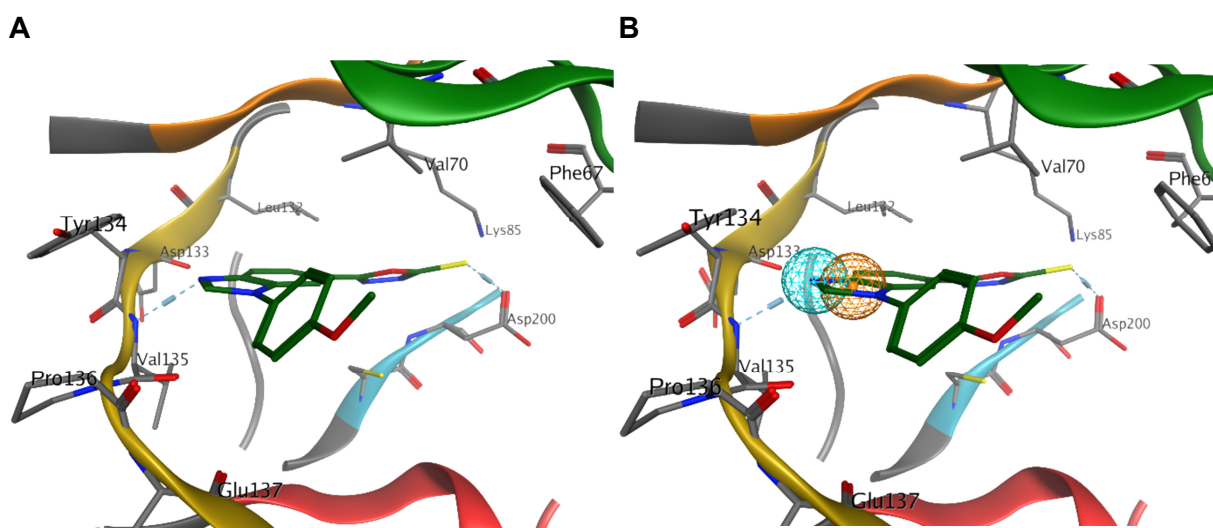


Abbildung 44: (A) Kokristallstruktur der GSK-3 $\beta$  mit Imidazol-Inhibitor (PDB Code 3F88). (B) Pharmakophormodell basierend auf dem kokristallisierten Inhibitor von 3F88. Das Pharmakophormodell wird dargestellt durch einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor (hellblaue Kugel) und einen aromatischen Ring (orange Kugel).

Das Pharmakophor-basierte Docking der Leitstrukturen **93-95** in die ATP-Bindungstasche GSK-3 $\beta$  wurde mit *Amber12:EHT* als Kraftfeld durchgeführt. Aus den generierten Posen wurden zuerst die 100 besten Posen durch die Scoring-Funktion *London dG* ausgewählt. Anschließend wurden die erhaltenen Posen zur Verfeinerung durch die MOE-interne *GBVI/WSA dG* Scoring-Funktion erneut bewertet. Die bekannten Kinase-Inhibitoren **87**, **90** und **92** und deren Kokristallstrukturen waren der Ausgangspunkt für den Entwurf der Leitstrukturen **93-95**. Im folgenden Verlauf werden daher alle durch das Docking erhaltenen Bindungsgeometrien von **93-95** analysiert und mit den in den Kokristallstrukturen vorliegenden Bindungsmodi der bekannten Kinase-Inhibitoren **87**, **90** und **92** verglichen.

**93** wurde von dem Aurorakinase Inhibitor **Tozasertib** (**87**) abgeleitet (Abbildung 45B). Die Kokristallstruktur von **Tozasertib** (**87**) in der Auroakinase B zeigt den Bindungsmodus einer Donor-Akzeptor-Donor Triade (Abbildung 45A). Dabei ist der Pyrazol-Ring in Richtung der Türsteher-Aminosäure (Leu170) gerichtet und bildet sowohl zur *gk+1* Aminosäure (Glu171) als auch zur *gk+3* Aminosäure (Ala173) eine Wasserstoffbrücke aus. Zusätzlich formt der Amino-Linker mit der *gk+3* Aminosäure eine Wasserstoffbrücke.



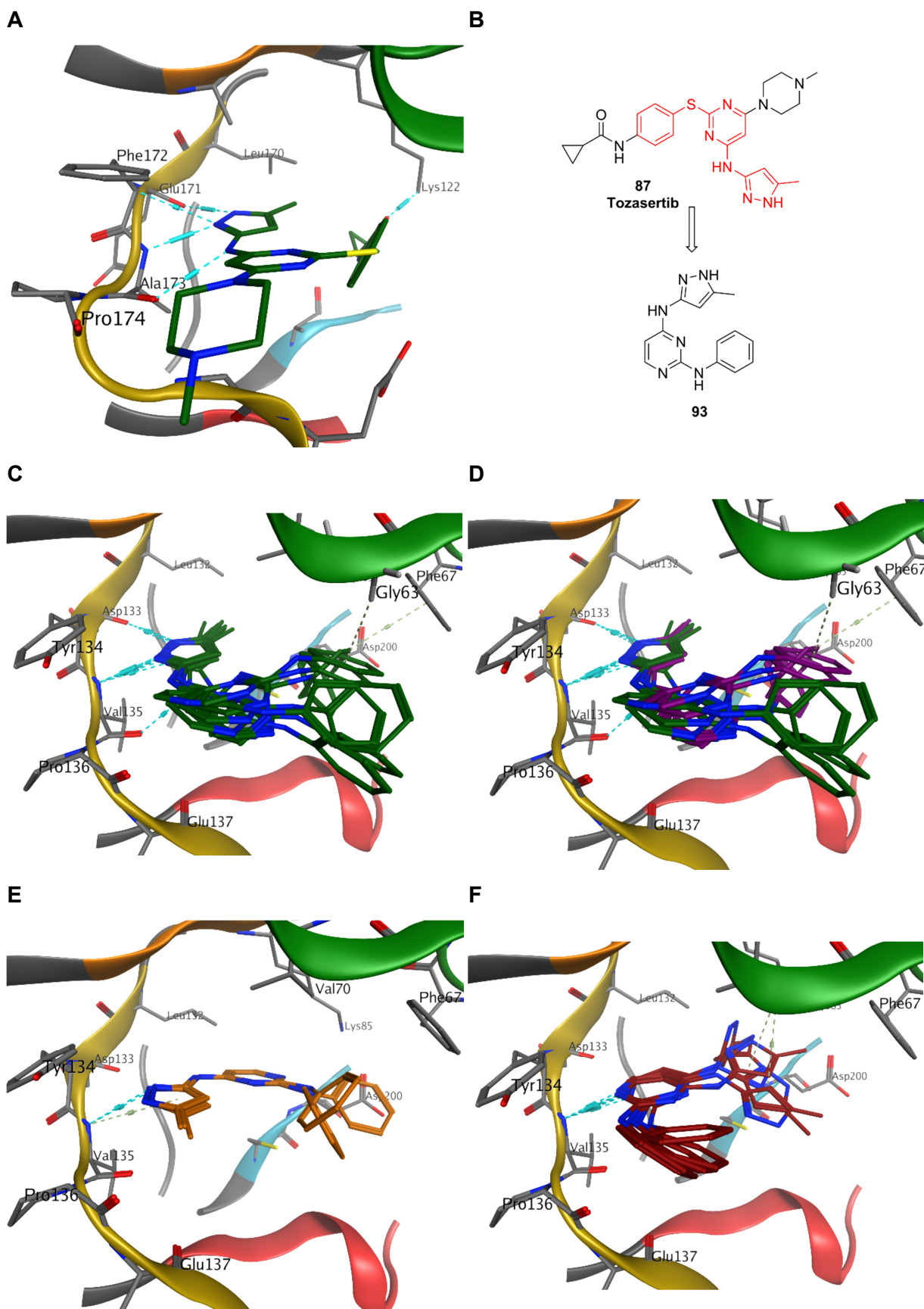


Abbildung 45: (A) Kokristallstruktur von **Tozasertib (87)** in der Aurorakinase B (PDB Code 4B8M). (B) Ableitung der potentiellen Leitstruktur **93** von **Tozasertib (87)**. (C) – (F) Aus dem Pharmakophor-basierten Docking erhaltene Konformationen von **93** in der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88). Die verschiedenen Konformationen wurden entsprechend ihrer Wechselwirkungen zur Gelenk-Region in drei verschiedene Bindungscluster (grün, rot und orange) eingeteilt.

Aus dem Docking von **93** wurden insgesamt 20 Posen generiert. Innerhalb dieser Posen können drei verschiedene Bindungscluster unterschieden werden. Der größte Cluster mit 10 Posen stimmt mit der Bindungsgeometrie von **Tozasertib (87)** überein (Abbildung 45C). Dabei interagiert der Pyrazol-Ring mit der gk+1 Aminosäure (Asp133) sowie mit der gk+3 Aminosäure (Val135). Die Wasserstoffbrücke über den Amino-Linker zu der Akzeptorfunktionalität von Val135 konnte nur bei einer einzigen Pose beobachtet werden. Der Pyrimidin-Ring zeigt bei diesem Bindungscluster von der Türsteher-Aminosäure (Leu132) weg. Aufgrund der Orientierung des Phenyl-Rings können diese zehn Posen nochmals in zwei weitere Gruppen unterteilt werden. Bei der einen Gruppe zeigen die Phenyl-Ringe in Richtung der Arg-reichen Schleife (Abbildung 45D, grüne Posen) und bei der anderen in Richtung DFG-Motiv (Abbildung 45D, lila Posen).

Der kleinste Bindungscluster mit gerade einmal drei Posen besitzt auch den Pyrazol-Ring als wechselwirkendes Element. Jedoch ist hierbei der Pyrimidin-Ring in Richtung der Türsteher-Aminosäure orientiert.

Neben dem Pyrazol-Ring kann auch der Pyrimidin-Ring mit der Gelenk-Region interagieren. Innerhalb des letzten Bindungsclusters weisen die Posen alle eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Pyrimidin-Ring und Val135 auf. Bei allen sieben Posen ist der Phenyl-Ring in Richtung Arg-reiche Schleife und der Pyrazol-Ring in Richtung DFG-Motiv gerichtet.

Aufgrund der vorhergesagten ausgezeichneten Interaktion von **93** mit der GSK-3 $\beta$  wird für **93** eine hohe Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  prognostiziert. Deshalb wurde bereits vor der Synthese und *in vitro* Testung von **93** das Derivat **93b** entworfen. Dabei wurde der Methyl-Substituent am Pyrrazol-Ring durch eine Cyclopropyl-Gruppe ausgetauscht (Abbildung 46).

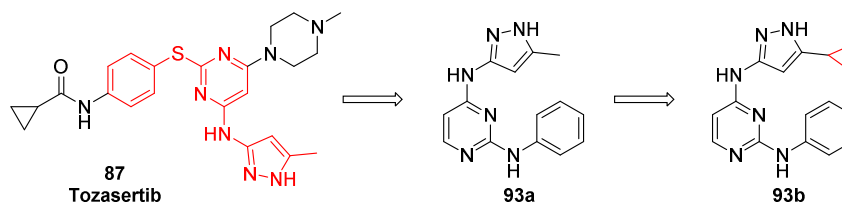


Abbildung 46: Ableitung der potentiellen Leitstruktur **93a** sowie deren Modifikation zu **93b**.

Aus dem Docking von **93b** wurden insgesamt 28 Posen, welche sich in zwei unterschiedliche Bindungscluster unterteilen lassen, identifiziert. Die eine Hälfte der Konformationen zeigt dabei den Pyrazol-Ring (Abbildung 47A) und die andere Hälfte



den Pyrimidin-Ring (Abbildung 47B) als wechselwirkendes Strukturelement. Der erste Bindungscluster kann aufgrund der Orientierung des Phenyl-Rings in weitere drei Gruppen (Abbildung 47A, grün, lila, gelb) differenziert werden. Am häufigsten zeigen dabei die Phenyl-Ringe (lila) in Richtung DFG-Motiv. Bei den restlichen Posen sind die Phenyl-Ringe entweder in Richtung der Arg-reiche Schleife (gelb) oder in Richtung Lösungsmittel (grün) orientiert.

Auch der zweite Bindungscluster kann in zwei weitere Gruppen unterteilt werden (Abbildung 47B). Diese unterscheiden sich entsprechend der Orientierung der Cyclopropyl-Gruppe. Dabei drehen sich die Cyclopropyl-Reste entweder ins Innere der ATP-Bindungstasche (rot) oder in Richtung der Taschenöffnung (petrolfarben).

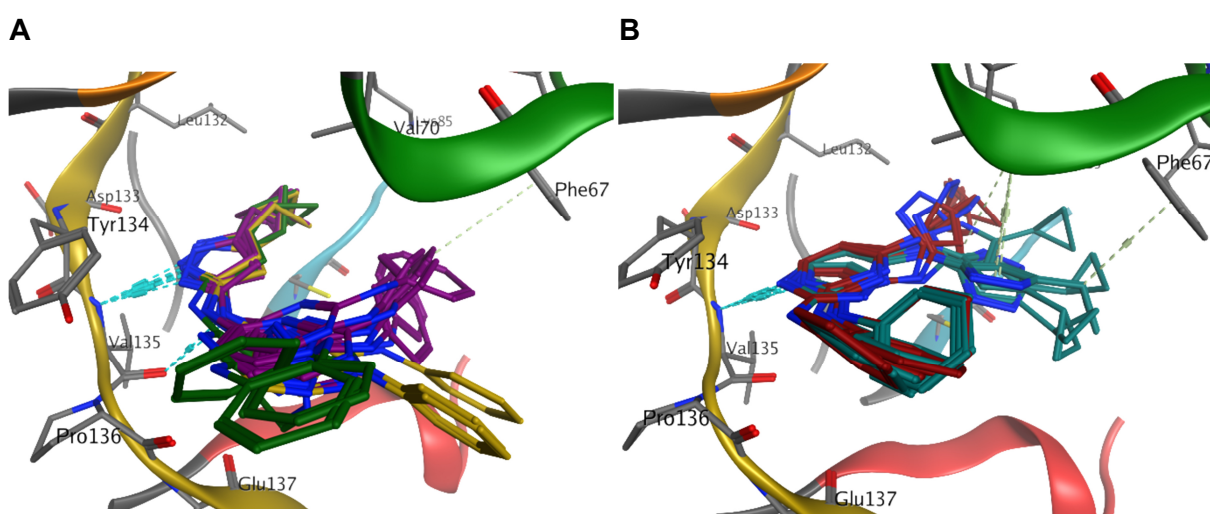


Abbildung 47: Aus dem Pharmakophor-basierten Docking erhaltene Konformationen von **93b** in der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88). Die verschiedenen Konformationen wurden entsprechend ihrer Wechselwirkungen zur Gelenk-Region in 2 verschiedene Bindungscluster (A) und (B) eingeteilt.

**94** wurde von **Gefitinib (92)**, einem Inhibitor der EGFR-Familie (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR), abgeleitet (Abbildung 48B). Innerhalb der Kokristallstruktur von **Gefitinib (92)** in der Kinase-Domäne des EGFR bildet ein Stickstoff-Atom des Quinazolin-Gerüsts eine Wasserstoffbrücke zu der gk+3 Aminosäure Met793 (Abbildung 48A) aus. Dies stimmt mit dem Bindungsmodus von **86** überein.

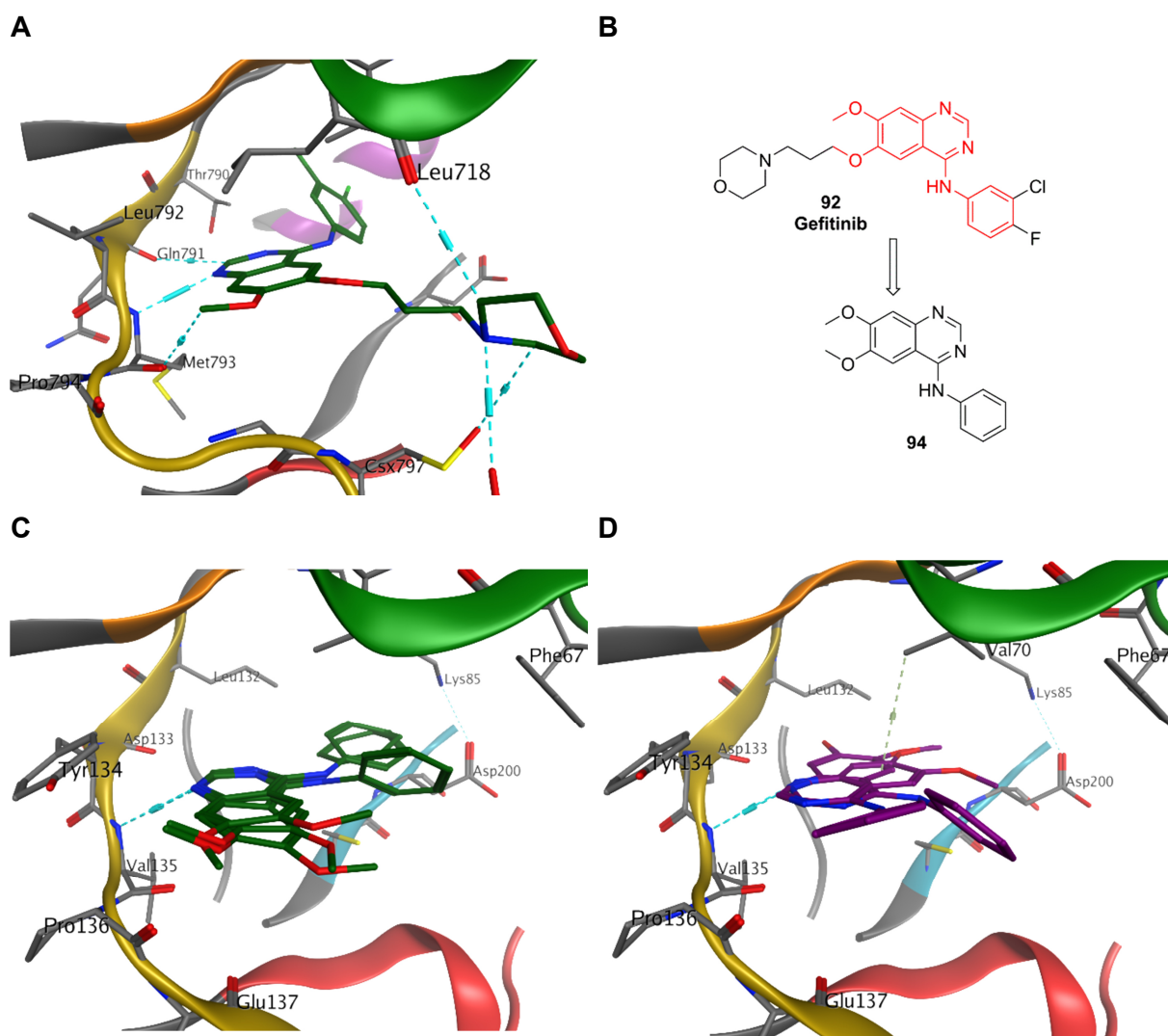


Abbildung 48: (A) Kokristallstruktur von **Gefitinib (92)** in der Kinasedomäne des EGFRs. (PDB Code 4WKQ). (B) Ableitung der potentiellen Leitstruktur **94** von **Gefitinib (92)**. (C) und (D) aus dem Pharmakophor-basierten Docking erhaltene Konformationen von **94** in der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88). Die Konformationen zeigen zwei unterschiedliche Orientierungen des Quinazolin-Gerüsts (grün und lila).

Das Pharmakophor-basierte Docking von **94** in die GSK-3 $\beta$  liefert nur fünf Posen. Innerhalb dieser Posen zeigen sich zwei verschiedene Orientierungen des Quinazolin-Gerüsts. Dabei ist der Pyrimidin-Ring entweder in Richtung der Türsteher-Aminosäure (Leu132) oder von dieser weg gerichtet. Unabhängig von der Orientierung des Pyrimidin-Rings ist bei allen Positionen eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Pyrimidin-Ring und der gk+3 Aminosäure (Val135) zu finden. Aufgrund der wenigen Wechselwirkungen und generierten Posen wird für **94** im Vergleich zu **93a/b** eine schwächere Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  erwartet.

**95** wurde von dem selektiven B-Raf Inhibitor **Vemurafenib (90)** abgeleitet (Abbildung 49B). Die Kokristallstruktur von **Vemurafenib (90)** in der onkogenen B-Raf Mutante V600E zeigt die übliche Orientierung des 7-Azaindol-Gerüsts mit dem Pyrrol-Ring in Richtung der Türsteher-Aminosäure (Thr82). Die NH-Gruppe des Pyrrol-Rings bindet über eine Wasserstoffbrücke an die gk+1 Aminosäure (Glu83) und das Stickstoff-Atom des Pyridins über eine weitere Wasserstoffbrücke an die Donorfunktionalität der gk+3 Aminosäure (Ala85).

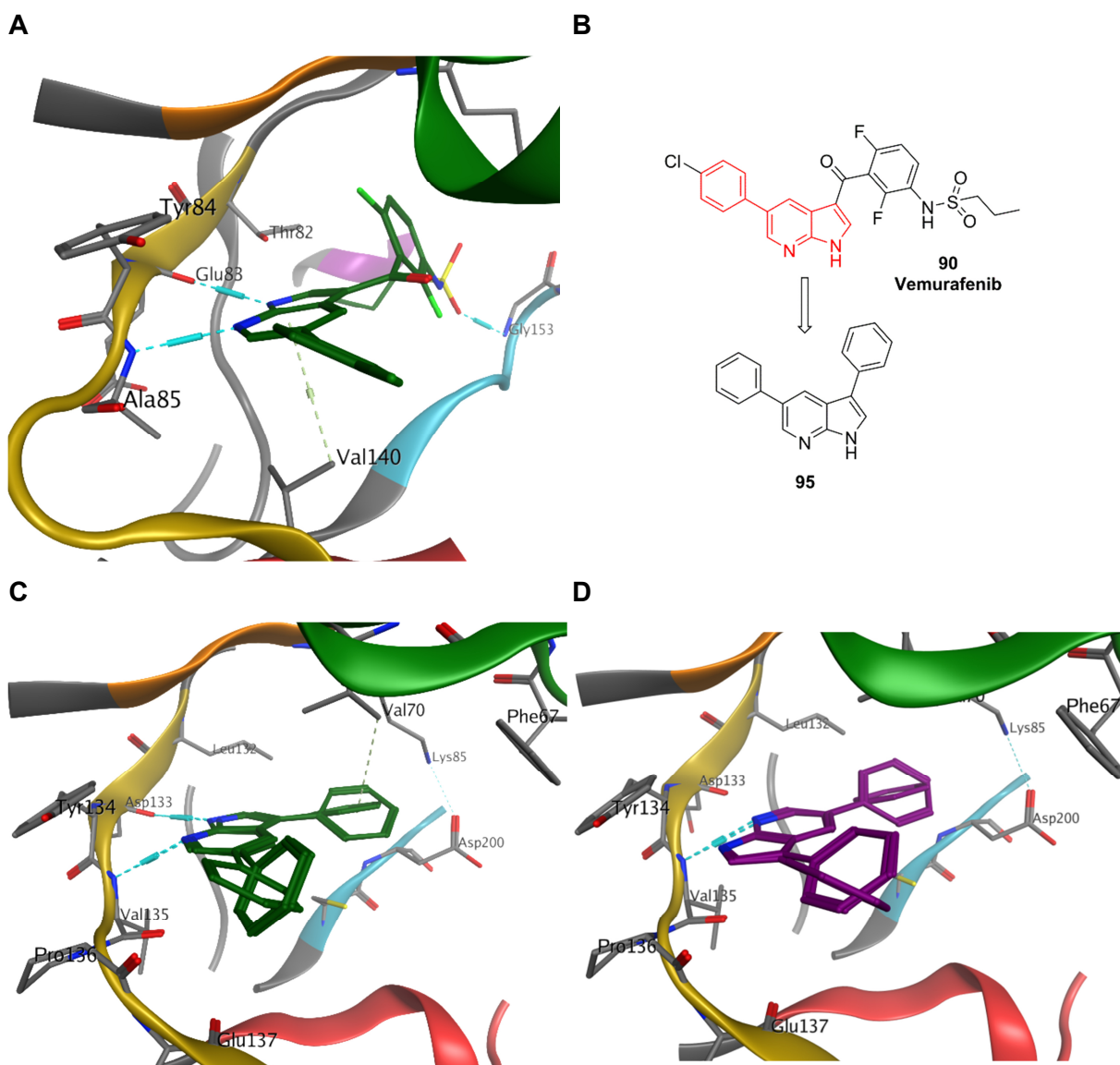


Abbildung 49: (A) Kokristallstruktur von **Vemurafenib (90)** in der B-Raf Mutante V600E. (PDB Code 3OG7). (B) Ableitung der potentiellen Leitstruktur **95** von **Vemurafenib (90)**. (C) und (D) aus dem Pharmakophor-basierten Docking erhaltene Konformationen von **95** in der GSK-3β (PDB Code 3F88). Die verschiedenen Konformationen wurden entsprechend der Orientierung des Azaindols in zwei verschiedene Bindungscluster (grün und lila) eingeteilt.

Das Docking von **95** in die GSK-3β liefert zwei mögliche Bindungsgeometrien des 7-Azaindols. Von den insgesamt fünf generierten Posen zeigen drei die bevorzugte

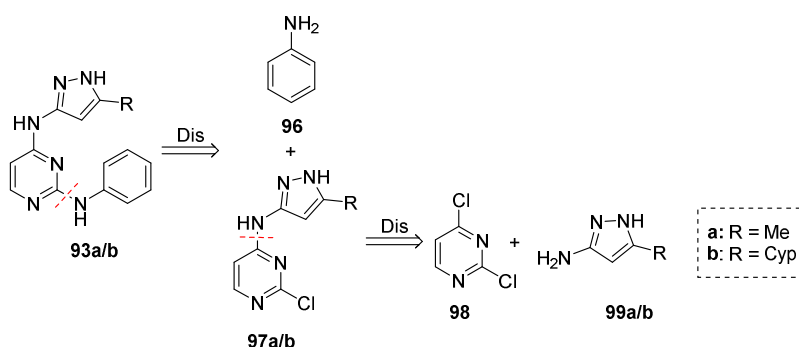
Orientierung des Pyrrol-Rings in Richtung der Türsteher-Aminosäure Leu132. Dabei können die zuvor beschriebenen Wasserstoffbrücken zur gk+1 sowie gk+3 Aminosäure beobachtet werden. Bei den beiden anderen Posen sind die Pyrrol-Ringe von Leu132 weg gerichtet. Diese Konformationen können nur über den Pyridin-Ring eine Wasserstoffbrücke zu Val135 aufbauen. Im Vergleich zu **93a/b** wird auch für **95** eine schwächere inhibitorische Wirkung gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  vermutet. Im weiteren Verlauf sollten **93a/b-95** synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  evaluiert werden.

### 3.4.2 Synthesestrategien der potentiellen GSK-3-Inhibitoren

Im folgenden Kapitel wird zunächst auf die retrosynthetische Zerlegung der gewünschten Zielmoleküle **93a/b-95** näher eingegangen. Innerhalb der Retrosynthesen werden voraussichtlich erforderliche Schutzgruppen oder möglicherweise vorliegende Isomere nicht beachtet. Im Anschluss erfolgt die Beschreibung der präparativen Arbeiten, indem die einzelnen Schritte des realisierten Synthesepfades detailliert dargestellt werden. Zum Schluss sind alle synthetisierten Inhibitoren sowie die erhaltenen Ausbeuten nochmals übersichtlich zusammengefasst.

#### Darstellung der Pyrazol-Pyrimidine **93a** und **93b**

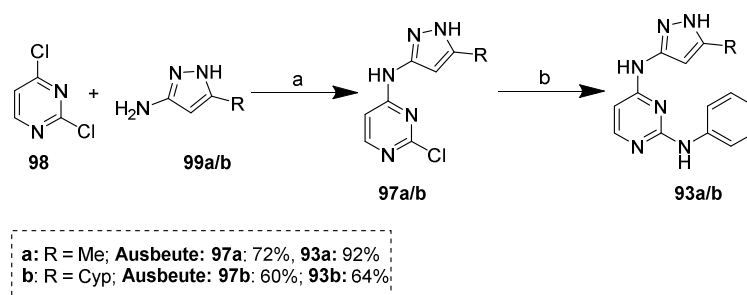
Bei der Retrosynthese von **93a** und **93b** werden nacheinander die beiden Amino-Bausteine von dem zentralen Pyrimidin-Ring abgespalten (Schema 19). Zuerst erfolgt die Abtrennung von Anilin (**96**) und danach die der Aminopyrazole **99a/b**.



Schema 19: Retrosynthese der Zielmoleküle **93a/b**.

In Anlehnung an *Kwarcinski et al.*<sup>[330]</sup> wurden die beiden Pyrazol-Pyrimidine **93a/b** über jeweils zwei Synthesestufen zugänglich gemacht (Schema 20). Im ersten Schritt

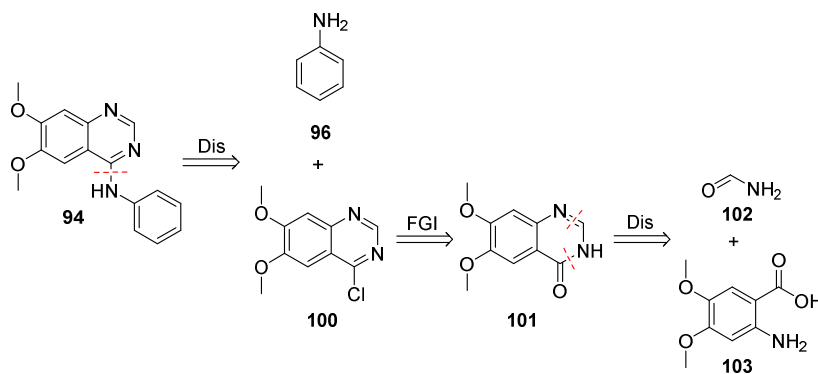
wurde das jeweilige Amino-Pyrazol **99a/b** durch DIPEA deprotoniert und gemäß einer nukleophilen aromatischen Substitution mit 2,4-Dichloropyrimidin (**98**) zu den entsprechenden Intermediaten **97a/b** in sehr guten Ausbeute von 72% (**97a**) und 92% (**97b**) umgesetzt. Im zweiten Schritt wurde Anilin (**96**) über eine säurekatalysierte nukleophile aromatische Substitution mit den resultierenden Bausteinen **97a/b** zu den entsprechenden Zielmolekülen **93a/b** verknüpft. Die Synthesen erfolgten in Anwesenheit von konzentrierter Salzsäure in *n*-BuOH bei 100°C und lieferten die gewünschten Produkte in guten Ausbeuten von 60% (**93a**) und 64% (**93b**).



Schema 20: Darstellung der Zielstrukturen **93a/b**. Reagenzien und Bedingungen: (a) DIPEA, DMSO, 60°C, 24 h, **97a**: 72%, **97b**: 92%; (b) Anilin, *n*-BuOH, konz. HCl, 100°C, 24 h, **93a**: 60%, **93b**: 64%.

## Darstellung des Quinazolins **94**

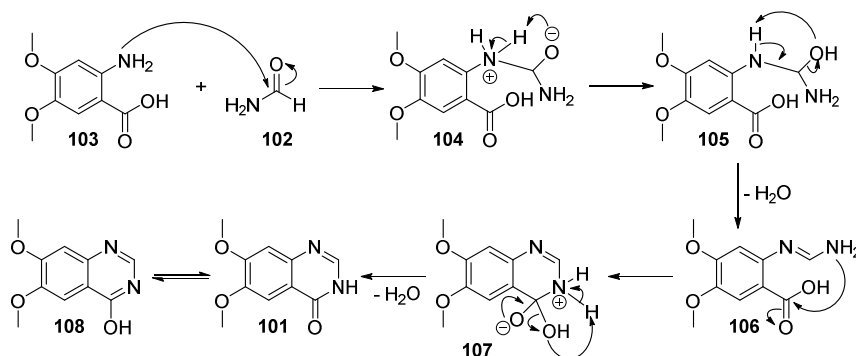
Bei der retrosynthetischen Zerlegung des Quinazolins **94** wird zuerst Anilin (**96**) hydrolytisch abgespalten (Schema 21). Anschließend wird die Chlor-Gruppe in **100** in die Carbonyl-Gruppe in **101** überführt. Der Umwandlung der funktionellen Gruppe folgt die Zerlegung des Pyrimidin-4-on Rings innerhalb des Quinazolins **101** in die Ausgangsstoffe **102** und **103**.



Schema 21: Retrosynthese des Quinazolin-Derivats **94**.

Die Synthese des Quinazolins **94** erfolgte in Anlehnung an Wang *et al.*<sup>[331]</sup> (Schema 23). Als Ausgangsmaterial diente die 4,5-Dimethoxy-anthranilsäure (**103**), welche mit Formamid entsprechend der Nientowski-Quinazolin-Synthese<sup>[332]</sup> zum Quinazolin **101** umgesetzt wurde.

Bei der ersten Reaktionsdurchführung wurde das Quinazolin **101** mit nur einer geringen Ausbeute von 15% erhalten. Mit dem Ziel die Ausbeute zu verbessern, wurde der zugrunde liegende Mechanismus der Nientowski-Quinazolin-Synthese genauer betrachtet (Schema 22). Dabei greift die Amino-Gruppe der Anthranilsäure (**103**) zuerst das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Formamids (**102**) an. Unter Wasserabspaltung wird das Imin-Intermediat **106** gebildet. Der nukleophile Angriff der Amino-Gruppe des Imins auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Anthranilsäure führt unter erneuter Wasserabspaltung zum Ringschluss und zur Bildung des Quinazolins **101**, welches in einer Keto-Enol-Tautomerie entweder als Keton **101** oder als Enol **108** vorliegen kann.

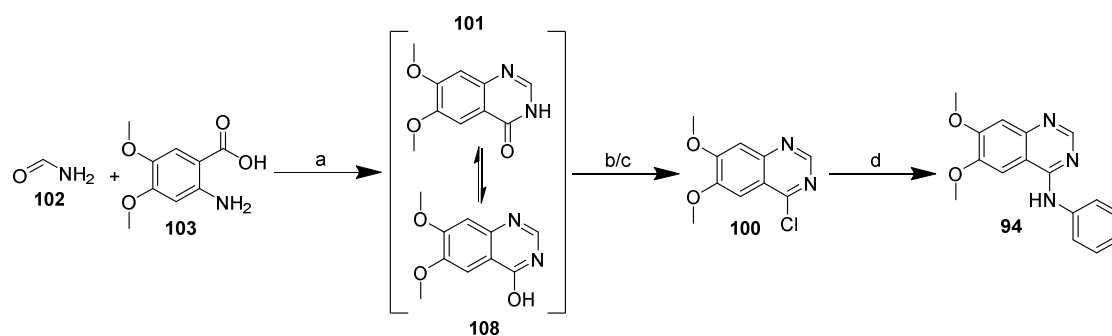


Schema 22: Mechanismus der Nientowski-Quinazolin-Synthese am Beispiel des Quinazolins **101**.

Die erste Quinazolinsynthese wurde in einem geschlossenen Mikrowellen-Gefäß bei 160°C durchgeführt. Gemäß dem vorliegenden Mechanismus kommt es zur Abspaltung von Wasser. Bei der Reaktionstemperatur von 160°C wird die Siedetemperatur von Wasser enorm überschritten und innerhalb des geschlossenen Gefäßes kommt es zum Druckanstieg, welcher den Fortschritt der Reaktion behindert. Die Erniedrigung der Reaktionstemperatur auf 95°C verschlechterte die Ausbeute auf sehr geringe 4%, da für die Ringbildung Temperaturen von 150-170°C erforderlich sind.

Daraufhin wurde die Reaktion klassisch in einem Rundkolben mit Rückflusskühlung durchgeführt. Dadurch konnte der Druckaufbau vermieden werden und die Ausbeute auf 39% gesteigert werden.





Schema 23: Darstellung des Quinazolins **94**: Reagenzien und Bedingungen: (a) 160°C, 16 h, 15% und 39%; (b) POCl<sub>3</sub>, Ar, 80°C, 8 h, 65%; (c) SOCl<sub>2</sub>, DMF, 75°C, 16 h, 96%; (d) **96**, *i*PrOH, 85°C, 16 h, 98%.

Die Chlorierung von **101** erfolgte mit Phosphorylchlorid im Überschuss. Bei einer kleinen Ansatzgröße von 50 mg von **101** wurde eine Ausbeute von 65% erzielt. Wurde jedoch die Ansatzgröße auf 700 mg erhöht, konnte die Reaktion aufgrund der Reinigung nicht reproduziert werden. Das überschüssige Phosphorylchlorid wurde bei dem größeren Ansatz aufgrund der größeren Menge ab destilliert. Das anschließend gemessene HPLC-Chromatogramm zeigte entgegen der Reaktionskontrolle nur noch Spuren des gewünschten Produkts **100**. Es wird vermutet, dass sich das Produkt während der Destillation aufgrund der hohen Temperaturen zersetzt hat.

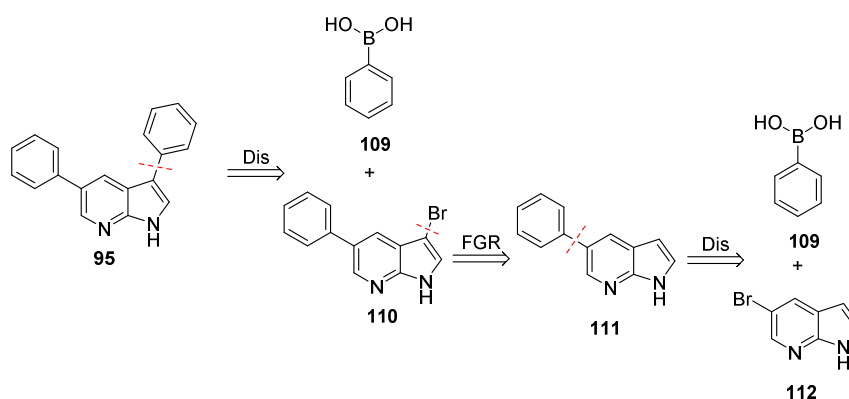
Zur Optimierung der Reaktion wurde das Chlorierungsmittel von Phosphorylchlorid zu Thionylchlorid gewechselt. **101** wurde in einem Überschuss an Thionylchlorid und einer Reaktionstemperatur von 75°C umgesetzt. Nach Beenden der Reaktion wurde Diethylether zum Reaktionsgemisch hinzugegeben, um das Reaktionsprodukt **100** zu fällen. Dabei konnte das gewünschte Produkt **100** mit einer Ausbeute von 96% erhalten werden (Schema 23).

Im letzten Syntheseschritt wurde Anilin (**96**) über eine nukleophile aromatische Substitution mit dem Quinazolin-Baustein **100** verknüpft. Das Zielmolekül **94** konnte in einer sehr guten Ausbeute von 98% dargestellt werden (Schema 23).

## Synthese des Azaindols **95**

Die Retrosynthese des Azaindols **95** beginnt mit der Zerlegung der C-C-Bindung zwischen dem Azaindol-Ring und dem Phenyl-Substituenten in Position 3 (Schema 24). Die Spaltung liefert die Phenylboronsäure (**109**) sowie das Bromid **110**. Die Abspaltung der Brom-Gruppe in **110** führt zu dem Azaindol **111**. Zuletzt wird der zweite Phenyl-Substituent in Position 5 vom Azaindol-Ring abgetrennt. Dies überführt

**111** in das kommerziell erhältliche 5-Brom-7-azaindol (**112**) und die Phenylboronsäure (**109**).



Schema 24: Retrosynthese des Azaindol-Derivats **95**.

Die Synthese von **95** erfolgte in Anlehnung an *Harris et al.*<sup>[333]</sup> Dabei sollte das pyrrolische Stickstoff-Atom innerhalb des Azaindol-Ringes für die geplante Suzuki-Reaktion mit einer Tosyl-Gruppe geschützt werden. Aufgrund des Anbringens und der Abspaltung der Schutzgruppe waren somit im Vergleich zur Retrosynthese zwei Synthesestufen mehr erforderlich. Die fünf-stufige Synthese von **95** wird im Folgenden genauer erläutert (Schema 25 und Schema 26).

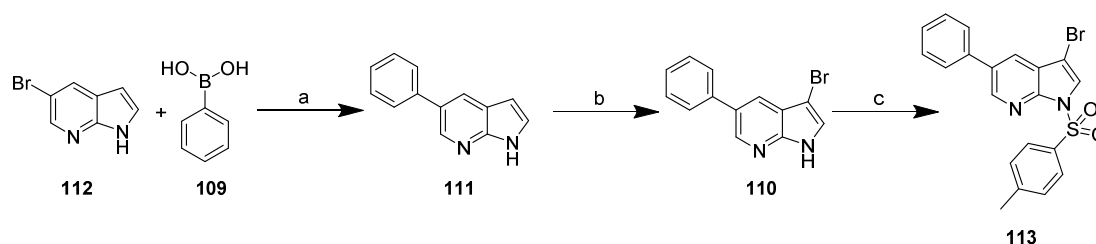
Im ersten Syntheseschritt wurde das 5-Brom-7-azaindol (**112**) mit der Phenylboronsäure (**109**) verknüpft (Schema 25). Die Reaktion erfolgte unter Suzuki-Bedingungen mit 0.5 mol%  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ -DCM-Komplex als Katalysator, Kaliumcarbonat als Base und einem Lösungsmittelgemisch aus Dioxan :  $\text{H}_2\text{O}$  im Verhältnis 2.5:1.0. Innerhalb dieser Pd-katalysierte Suzuki-Reaktion war keine Schutzgruppe für das Stickstoff-Atom des Pyrrol-Rings nötig, da die Verknüpfung an der räumlich entfernten Position 5 stattfand.

Mithilfe des Bromierungsreagenzes NBS wurde der Azaindol-Ring zu **110** bromiert. Die Bromierung erfolgte selektiv an Position 3 und lieferte das gewünschte Produkt **110** in sehr guter Ausbeute von 92% (Schema 25).

Im weiteren Verlauf sollte an Position 3 mittels einer Pd-katalysierten Suzuki-Kupplung ein weiterer Phenyl-Ring angebracht werden. In räumlicher Nähe zu dem Brom-Substituenten an Position 3 befindet sich jedoch das pyrrolische Stickstoff-Atom. Um dessen Koordination an das Pd-Zentrum des Katalysators zu vermeiden, wurde dieses mittels einer Tosyl-Gruppe geschützt. Die Umsetzung von **110** mit Tosylchlorid, 4 N Natriumhydroxid-Lösung und Tetrabutylammoniumchlorid als



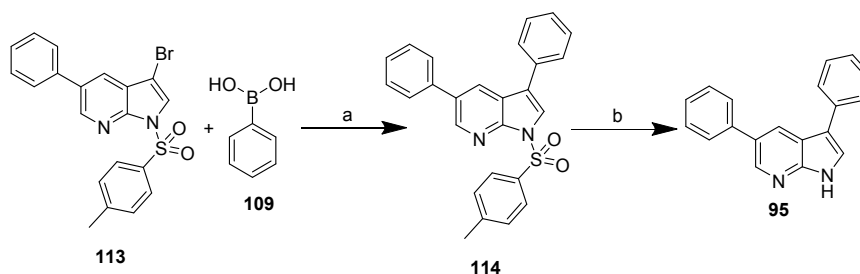
Katalysator ergab das geschützte Produkt **113** in einer sehr guten Ausbeute von 99% (Schema 25).



Schema 25: Darstellung des Tosyl-geschützten Intermediats **113**: Reagenzien und Bedingungen: (a)  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Dioxan :  $\text{H}_2\text{O}$  2.5:1.0,  $80^\circ\text{C}$ , 2 d, 82%; (b) NBS,  $\text{CHCl}_3$ , RT, 1 h, 92%; (c) TsCl, 4 N aq NaOH, TBACl, DCM,  $0^\circ\text{C}$ -RT, 16 h, 99%.

Das Tosyl-geschützte Bromid **113** konnte anschließend in der Pd-katalysierten Suzuki-Reaktion umgesetzt werden (Schema 26). Als Kupplungspartner wurde dabei die Phenylboronsäure (**109**) eingesetzt. Die Reaktion wurde mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) als Katalysator, 2 N Natriumcarbonat-Lösung als Base und einem Lösungsmittelgemisch aus Toluol : Ethanol im Verhältnis 1:1 durchgeführt.

Im letzten Syntheseschritt wurde die Tosyl-Schutzgruppe unter basischen Bedingungen abgespalten und die Zielstruktur **95** konnte in einer guten Ausbeute von 73% erhalten werden.

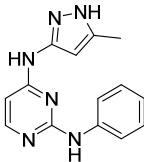
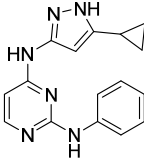
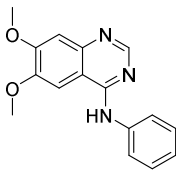
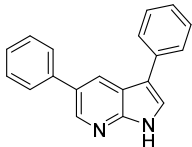


Schema 26: Darstellung der Zielstruktur **95**: Reagenzien und Bedingungen: (a)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 2 N aq  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Toluol : EtOH 1:1,  $80^\circ\text{C}$ , 2 d, 65%; (b) 4 N aq NaOH, MeOH,  $50^\circ\text{C}$ , 24 h, 73%.

## Überblick der synthetisierten Strukturen

In Tabelle 24 sind die in diesem Kapitel dargestellten Substanzen **93a/b-95** sowie die erzielten Ausbeuten und Reinheiten zusammengefasst.

Tabelle 24: Überblick der synthetisierten Substanzen **93a/b-95**.

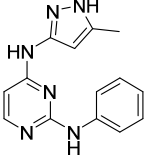
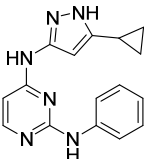
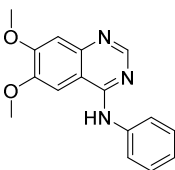
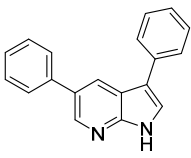
Verbindung	BSc-Nummer	Struktur	Ausbeute [%] <sup>a</sup>	HPLC-Reinheit [%]
93a	5224		60	99
93b	5231		64	97
94	5225		98	100
95	5226		73	97

<sup>a</sup> Ausbeute bezogen auf die letzte Synthesestufe.

### 3.4.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Leitstrukturen 93a/b-95

Die Aktivität der synthetisierten Strukturen **93a/b-95** gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  wurde von dem Dienstleistungsunternehmen *Cerep* gemessen (siehe Abschnitt 5.6.1). Als Messergebnisse sind in Tabelle 25 die %-Inhibitionen der getesteten Substanzen gegenüber der spezifischen Kontrollaktivität von Staurosporin (siehe Abschnitt 3.1.4) bei einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu$ M angegeben.

Tabelle 25: Inhibitorische Aktivität von **93a/b-95** gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ .

Verbindung	Struktur	GSK-3 $\alpha$ %-Inhibition	GSK-3 $\beta$ %-Inhibition
		bei 1 $\mu$ M der Testsubstanz	
BSc5224 ( <b>93a</b> )		50	47
BSc5231 ( <b>93b</b> )		74	76
BSc5225 ( <b>94</b> )		0	0
BSc5226 ( <b>95</b> )		8	2

Für die Analyse der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden alle aus dem anfänglichen Docking erhaltenen Posen nochmals mit der wissensbasierten *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion bewertet, um die günstigsten Bindungsgeometrien zu finden.

Mit einer %-Inhibition von 50% gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und 47% gegenüber der GSK-3 $\beta$  inhibiert **BSc5224 (93a)** beide Isoformen im mittleren Bereich. Wie bereits aus den Docking-Studien erwartet liegt keine isoform-spezifische Selektivität vor. Die Substitution der Methyl- durch die Cyclopropyl-Gruppe in **BSc5231 (93b)** führt zur Steigerung der hemmenden Wirkung gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ . Erstaunlicherweise werden von der *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion die Konformationen von **BSc5224 (93a)** und **BSc5231 (93b)** am besten bewertet, bei denen der Pyrimidin-Ring und nicht der Pyrazol-Ring an die Gelenk-Region bindet. Diese Bindungsgeometrien prognostizieren ebenso eine Zunahme der Aktivität von **BSc5224 (93a)** zu **BSc5231 (93b)** (Abbildung 50). **BSc5224 (93a)** und



**BSc5225 (95)** weist keine inhibitorische Wirkung gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  auf. Das Protein/Liganden-Docking von **BSc5225 (94)** prognostiziert lediglich eine Wasserstoffbrücke zu Val135, der gk+3 Aminosäure der Gelenk-Region (Abbildung 51A).

**BSc5226 (95)** zeigt eine sehr schwache Aktivität gegenüber beiden Isoformen. Entsprechend der am besten bewerteten Bindungsgeometrie von **BSc5226 (95)** würde sich eine höhere Aktivität vermuten lassen (Abbildung 51B). Innerhalb des Protein/Liganden-Docking werden Wasserstoffbrücken zwischen der NH-Gruppe des Pyrrol-Rings und Asp133 sowie zwischen dem Stickstoff-Atom des Pyridins und Val135 vorhergesagt. Außerdem interagiert **BSc5226 (95)** über eine H- $\pi$ -Wechselwirkungen über den Phenyl-Ring mit Val70. Die geringe Aktivität von **BSc5226 (95)** gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  kann daher mithilfe des Dockings nicht erklärt werden.

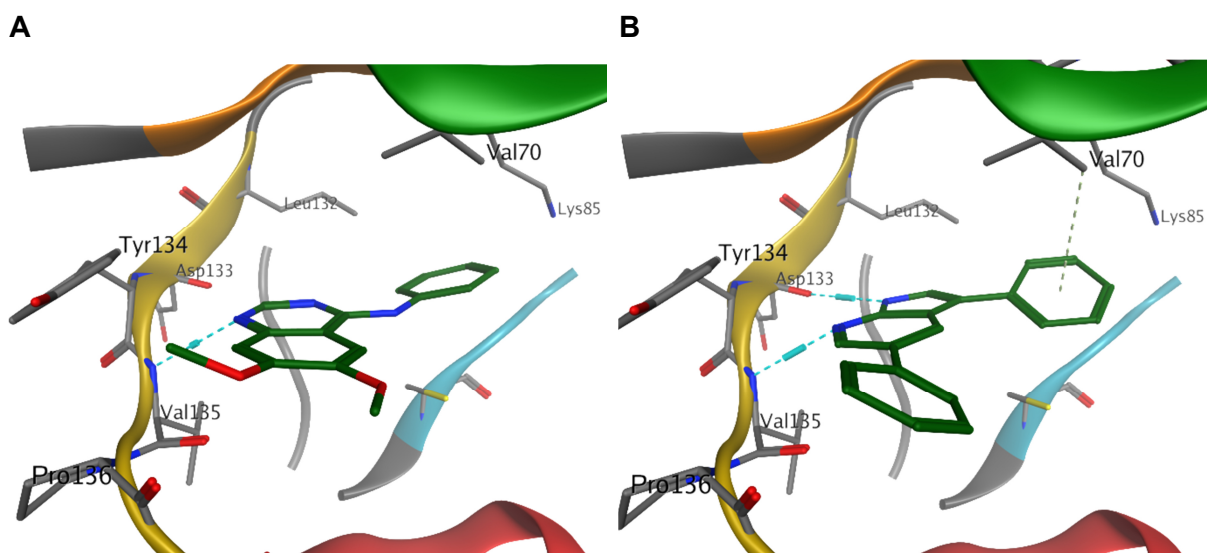


Abbildung 51: Protein/Liganden-Docking von **BSc5225 (94)** (A) und **BSc5226 (95)** (B) in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88). Verwendete Software: *MOE 2014.0901*.

### 3.4.4 Zusammenfassung und Ausblick: Liganden-basierte Leitstrukturentwicklung

Im Rahmen dieses Projekts dienten Liganden-basierte Ansätze der Ermittlung von neuen Leitstrukturen mit einer Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ . Dabei wurden die Strukturen der bereits bekannten Kinase-Inhibitoren **Tozasertib** (87), **Gefitinib** (92) und **Vemurafenib** (90) auf Basis von bevorzugter Molekülgrundgerüsten abgewandelt und daraus die potentiellen Leitstrukturen **93-95** entworfen. Bei der Computer-gestützten Analyse möglicher Interaktionen der Strukturen mit der GSK-3 $\beta$  konnten gängige Donor-/Akzeptor-Wechselwirkungen der Struktur motive mit der ATP-Bindungstasche identifiziert werden. Aufgrund der hervorragenden Wechselwirkungen von **93** mit der GSK-3 $\beta$  wurde zusätzlich das Cyclopropyl-Derivat **93b** als Strukturidee hinzugefügt. Anschließend konnten alle vier Strukturkandidaten erfolgreich synthetisiert werden und *in vitro* auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  getestet werden.

**BSc5226** (95) zeigt dabei nur eine sehr schwache hemmende Wirkung, während **BSc5225** (94) überhaupt keine Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  besitzt. **BSc5224** (93a) und **BSc5231** (93b) inhibieren hingegen die GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  sehr gut. Im Vergleich zeigt **BSc5231** (93b) eine höhere Aktivität als **BSc5224** (93a). Eine Isoform-Selektivität wird bei keiner der Verbindungen beobachtet.

Das Ziel zukünftiger Forschung sollte daher das Erreichen einer Isoform-Selektivität sein. Für nachfolgende Arbeiten scheint es sinnvoll **BSc5231** (93b), aufgrund der hohen inhibitorischen Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ , als Ausgangspunkt für Optimierungen zu verwenden. Durch die Einführung eines zweiten Phenyl-Rings soll **BSc5231** (93b) in Richtung der Arg-reichen Schleife verlängert werden (Abbildung 52). Durch *para*-Substituenten wie Nitril- oder Fluor-Gruppen soll eine Interaktion mit der Arg-reichen Schleife erzeugt werden. Dies könnte zu der gewünschten Isoform-Selektivität führen.

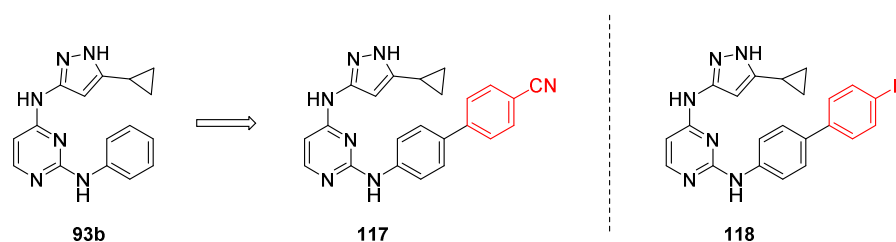
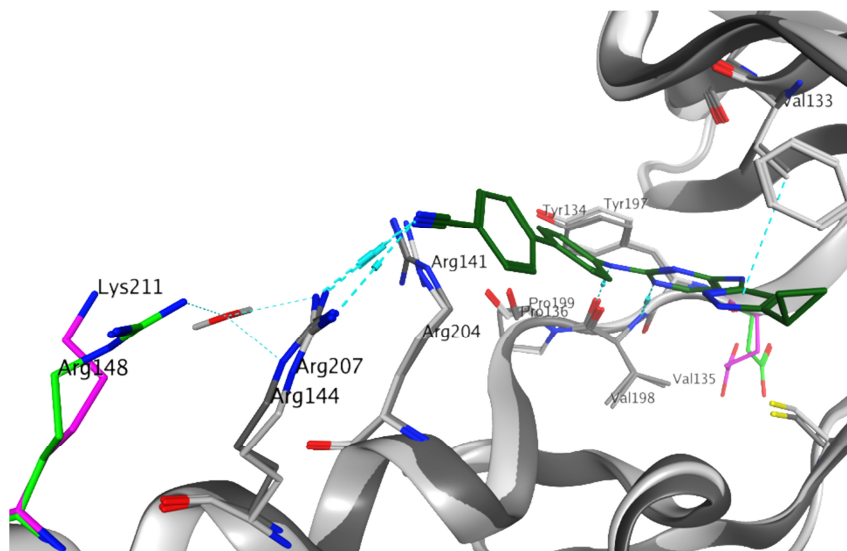


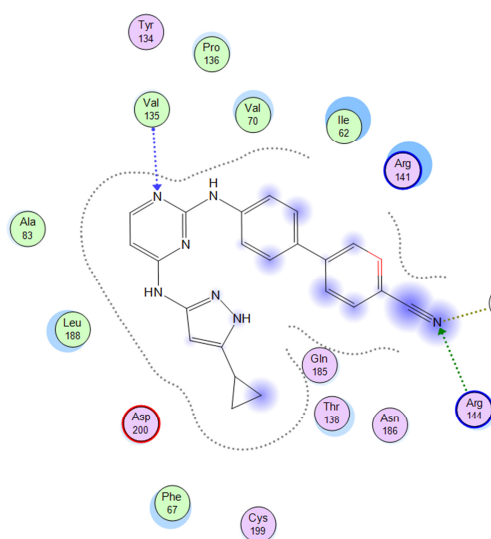
Abbildung 52: Potentielle Modifikationen von **BSc5231**(93b) zur Verbesserung der Isoform-Selektivität.

Mithilfe von Protein/Liganden-Docking von **117** und **118** in das Homologiemodell der GSK-3 $\beta$  und der überlagerten Aminosäuresequenz der GSK-3 $\alpha$  wurden die beiden Inhibitor-kandidaten bereits auf Plausibilität überprüft. **117** und **118** zeigen dabei die erwarteten Interaktionen mit der Arg-reichen Schleife. Repräsentativ ist in Abbildung 53 das Docking von **117** abgebildet.

**A**



**B**



**C**

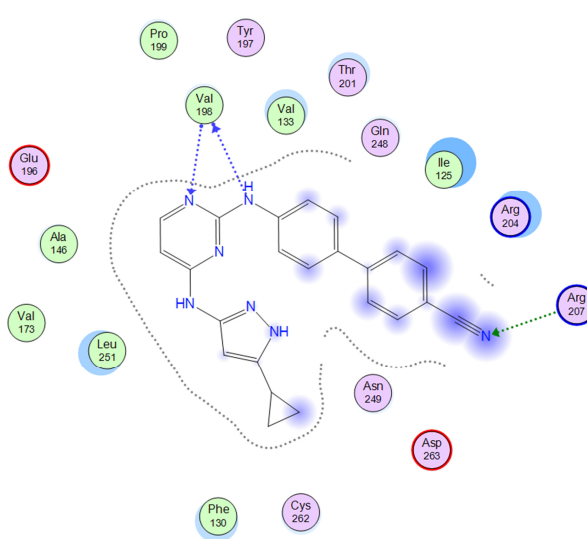



Abbildung 53: (A) Docking von **117** in das Homologiemodell der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88) und der überlagerten Aminosäuresequenz der GSK-3 $\alpha$  (UniProtKB P49840). Aminosäurepositionen in denen sich beide Isoformen unterscheiden sind farblich hervorgehoben. GSK-3 $\beta$ : Grün und GSK-3 $\alpha$ : Pink. (B) und (C) 2-Dimensionale Ligand-Protein-Interaktionskarte der besten Konformation von **117** in der GSK-3 $\beta$  (B) und der GSK-3 $\alpha$  (C). Verwendete Software: MOE 2014.0901.

Zusätzlich zu den Wechselwirkungen mit der Arg-reichen Schleife zeigt sich bei **117** ein interessanter Unterschied zwischen den Interaktionen von **117** mit den Gelenk-Regionen der beiden Isoformen. Bei der GSK-3 $\beta$  wird für **117** nur eine monodentate



---

Interaktion mit der Gelenk-Region prognostiziert (Abbildung 53B), während bei dem Homologiemodell der GSK-3 $\alpha$  eine bidentate Interaktion (Abbildung 53C) mit der Gelenk-Region vorhergesagt wird. Aufgrund der prognostizierten Interaktionen ist für **117** nicht nur eine hohe Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  sondern auch eine signifikante  $\alpha$ -Selektivität möglich.



### 3.5 Tivantinib als potentieller $\alpha$ -selektiver GSK-3-Inhibitor

Der Inhalt dieses Kapitels wird voraussichtlich 2016 zur Veröffentlichung eingereicht.

**Autoren:** Theresa Neumann, Lina Benajiba, Kimberly Stegmaier, Boris Schmidt.

**Titel:** Tivantinib repurposing as a new potential therapy in AML: from c-Met to GSK-3 $\alpha$  Inhibition.

**Tivantinib (115, ARQ197)** wurde ursprünglich von *ArQule* als potenter und selektiver c-Met Inhibitor entwickelt (Abbildung 54).<sup>[334]</sup> c-Met ist eine Rezeptortyrosinkinase, die mit hoher Affinität den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (*hepatocyte growth factor*, HGF) bindet. Der HGF/c-Met-Signalweg ist in vielen Krebsarten häufig fehlreguliert. Die Aktivierung von c-Met ruft verschiedene Tumor-fördernde Wirkungen hervor, da onkogene Signalwege aktiviert werden, welche die Zellproliferation, die Angiogenese, das Tumorüberleben und die Metastasierung begünstigen.<sup>[335-337]</sup> c-Met wird durch das Protoonkogen MET kodiert. Dabei können die MET Amplifikation, Hochregulierung der Transkription oder aktivierende MET Mutationen eine anormale Aktivierung von c-MET verursachen.<sup>[336]</sup> Die MET Amplifikation kann außerdem zur Entstehung von Resistenzen der Krebszellen gegenüber zielgerichteter Medikamenten, wie beispielsweise EGFR Inhibitoren in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (*non-small cell lung cancer*, NSCLC), führen.<sup>[336, 338]</sup> c-Met ist daher ein weit verbreitetes *Target* für die Krebstherapie, mit zahlreichen Inhibitoren in aktiven klinischen Studien.

**Tivantinib (115)** zeigte bereits in frühen klinischen Studien Antitumor-Wirkung, welche durch die Inhibition von c-Met begründet wurde. Die Kokristallstruktur von c-Met mit **Tivantinib (115)** zeigt, dass **Tivantinib (115)** an die inaktive Konformation der c-Met bindet. Folglich wird die c-Met in einem nicht-ATP-kompetitiven Mechanismus von **Tivantinib (115)** gehemmt.<sup>[336, 339]</sup>

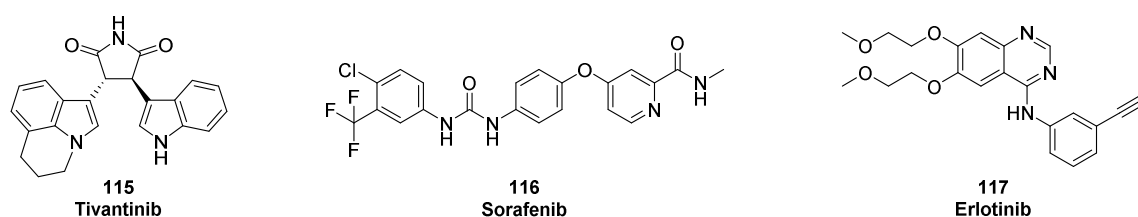


Abbildung 54: Strukturen der Inhibitoren; **Tivantinib (115)**, **Sorafenib (116)** und **Erlotinib (117)**.<sup>[334, 340-341]</sup>

**Tivantinib (115)** befindet sich derzeit in zwei Phase-III-Studien. Die erste Phase-III-Studie von **Tivantinib (115)** wird an Patienten mit Leberzellkarzinom, welche zuvor

mit einer **Sorafenib**-Therapie (116, Multikinase-Inhibitor: C-Raf und B-Raf aus der Raf-Kinase Familie und verschiedene Tyrosinkinasen z.B. VEGFR oder PDGFR), behandelt wurden, dabei jedoch Resistenzen entwickelten durchgeführt (Abbildung 54).<sup>[342]</sup> Bei der zweiten Phase-III-Studie handelt es sich um eine Kombinationstherapie aus **Tivantinib** (115) und **Erlotinib** (117) (EGFR-Inhibitor) für nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (Abbildung 54).<sup>[343]</sup> **Tivantinib** (115) soll dabei der Entstehung von Resistenzen gegenüber **Erlotinib** entgegenwirken. Dabei zeigte **Tivantinib** (115) auch bei Lungenkrebs-Patienten mit KRAS-Mutationen Antitumor Aktivität.<sup>[344-345]</sup> Krebsarten mit KRAS-Mutationen stehen allerdings in keinem Zusammenhang mit der c-Met Aktivität. Des Weiteren konnte mit **Tivantinib** (115) auch in diversen anderen Krebs-Zelllinien, welche unabhängig von den c-Met Signalweg sind, Antitumor-Aktivität erzielt werden.<sup>[344]</sup> Neue Studien zeigen außerdem, dass **Tivantinib** (115) die Mikrotubulidynamik verändert.<sup>[336-337, 346-347]</sup> Diese neuen Beobachtungen lassen vermuten, dass die Antitumor-Eigenschaften von **Tivantinib** (115) nicht durch die Hemmung der c-Met erzeugt werden. 2014 wurden von *Rix et al.* die beiden Isoformen der GSK-3 mit Hilfe der chemischen Proteomik an A549 NSCLC-Zellen als neues *Target* von **Tivantinib** (115) identifiziert.<sup>[344]</sup> Die Arbeitsgruppe zeigte, dass **Tivantinib** (115) die GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  viel stärker als die c-Met inhibiert. Somit wiesen sie nach, dass c-Met nur ein sehr schwaches *Target* von **Tivantinib** (115) ist und dessen Antitumor-Aktivität daher nicht durch die Hemmung der c-Met stammen kann.<sup>[344]</sup>

In siRNA-Experimenten konnten *Rix et al.* durch den Verlust der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  die Apoptose der NSCLC Zellen einleiten und so den Einfluss beider Isoformen auf die molekularen Mechanismen innerhalb der A549 NSCLC belegen. Zudem beobachteten *Rix et al.*, dass **Tivantinib** (115) die  $\alpha$ -Isoform der GSK-3 stärker inhibiert als die  $\beta$ -Isoform.<sup>[344]</sup> Demzufolge wäre **Tivantinib** (115) der erste  $\alpha$ -selektive GSK-3-Inhibitor innerhalb der klinischen Prüfung. Infolgedessen sollte in dieser Arbeit **Tivantinib** (115) auf seine inhibitorische Aktivität gegenüber GSK-3 $\alpha/\beta$  sowie c-Met getestet werden. Im Vergleich mit **Tivantinib** (115) sollte so das therapeutische Potential der eigenen GSK-3-Inhibitoren eingeschätzt werden.

### 3.5.1 *In vitro* Aktivität von Tivantinib gegenüber GSK-3 $\alpha$ / $\beta$ im Vergleich zu c-Met

Rix *et al.* identifizierten die GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  als bedeutendes *Target* von **Tivantinib (115)**. Um dies selbst zu evaluieren wurde **Tivantinib (115)** von dem Unternehmen *Cerep* auf seine Kinaseaktivität gegenüber GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  sowie c-Met getestet. Zuvor wurde **Tivantinib (115)** in enantiomerenreiner Form, als **(3*R*, 4*R*)-(-)-Tivantinib (115)**, mit einer Reinheit von >98% von *ChemScene LLC* erworben. Die Assay Bedingungen zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte werden ausführlich in Abschnitt 5.6.1 für GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  und in Abschnitt 5.6.4 für c-Met beschrieben.

Wie bereits erwartet inhibiert **Tivantinib (115)** die beiden Isoformen der GSK-3 deutlich stärker als das ursprünglich zuge dachte Zielprotein c-Met. Im Vergleich wird c-Met mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 63  $\mu$ M 10-mal schwächer inhibiert als die GSK-3 $\alpha$  mit 6.3  $\mu$ M. Außerdem inhibiert **Tivantinib (115)** die GSK-3 $\alpha$  5-fach stärker als die GSK-3 $\beta$  (32  $\mu$ M). Die gemessenen IC<sub>50</sub>-Werte bestätigen die These von Rix *et al.*, dass es sich bei **Tivantinib (115)** um einen  $\alpha$ -selektiven GSK-3-Inhibitor handelt.

**Tivantinib (115)** ist im Vergleich zu dem eigenen Inhibitor **BSc5090 (36)**, dessen IC<sub>50</sub>-Werte im nanomolaren Bereich liegen, jedoch ein schwächerer GSK-3-Inhibitor. Dies bestärkt das therapeutische Potential des eigenen Inhibitors **BSc5090 (36)**.

Tabelle 26. IC<sub>50</sub>-Werte von **Tivantinib (115)** gegenüber GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  sowie c-Met.

Verbindung	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\alpha$ [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\beta$ [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> c-Met [ $\mu$ M]
<b>Tivantinib (115)</b>	6.3	32.0	63.0

Mit einem Protein/Liganden-Docking von **Tivantinib (115)** in das unter Abschnitt 3.1.5 erstellte Homologiemodell der GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  wurden die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen untersucht. Mithilfe der gewonnenen Kenntnisse sollte die  $\alpha$ -Selektivität von **Tivantinib (115)** aufgeklärt werden.

Das Docking von **Tivantinib (115)** in das Homologiemodell der GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  erfolgt mit dem Kraftfeld *Amber12:EHT*. Um aus den 1000 generierten Posen die 30 besten zu finden wurden die Konformationen mit der Scoring-Funktion *London dG* bewertet. Aus diesen Posen wurde wiederum die wahrscheinlichste Konformation mithilfe der *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion identifiziert.

Die erhaltene Bindungsgeometrie prognostiziert sehr gute Wechselwirkungen zwischen **Tivantinib (115)** und beiden Isoformen der GSK-3 (Abbildung 55). Über die



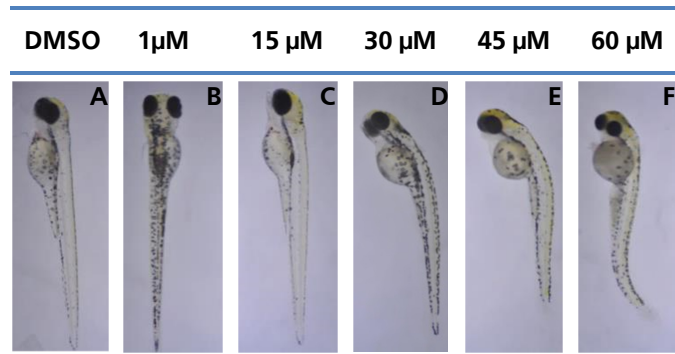
---

GSK-3 $\alpha$ ) für die unterschiedliche Aktivität gegenüber den Isoformen verantwortlich sein könnten (Abbildung 55B). Arg141 und Arg204 liegen in der ersten Windung der Arg-reichen Schleife der beiden Isoformen. Somit sind ihre nächsten benachbarten Aminosäuren Arg141 und Arg207, welche wiederum benachbart zu Arg148 (grün) und Lys211 (pink) sind. Der Grund für die Isoform-Selektivität von **Tivantinib (115)** wird daher, wie bereits in Abschnitt 3.1.5, in den unterschiedlichen Aminosäuren innerhalb der Arg-reichen Schleife vermutet. Somit wird den beiden Aminosäuren Arg148 (grün) und Lys211 (pink) auch im Fall des **Tivantinib (115)** eine Schlüsselfunktion für die Isoform-Selektivität zugeschrieben. Wie jedoch bereits zuvor erwähnt (siehe Abschnitt 3.1.5) müsste die aufgestellte Hypothese durch eine Kokristallisation bestätigt werden.

### 3.5.2 *In vivo* Evaluation von Tivantinib im Zebrafisch-Embryo

Mithilfe des *in vivo* Zebrafisch-Embryonen-Assays lässt sich neben der Evaluation der Toxizität eines Wirkstoffs durch spezifische Phänotypen auch dessen Wirksamkeit gegenüber bestimmten Zielproteinen nachweisen. **Tivantinib (115)** wurde daher auf seine *in vivo* Aktivität im Wildtyp-Zebrafisch-Embryo (*Danio rerio wild*) getestet (siehe Abschnitt 5.8.5). Dazu wurden wässrige **Tivantinib (115)**-Lösungen zwischen 1 und 60  $\mu$ M 24 hpf zu den Zebrafischlarven gegeben und deren Entwicklung für weitere 4 d beobachtet. Über den gesamten Konzentrationsbereich zeigte sich innerhalb des Beobachtungszeitraums keine Letalität. Außerdem schlüpften alle Embryonen, die der Wirkstofflösungen und die der Kontrolllösung, gleichzeitig am 4 dpf. Bei einer Raumtemperatur von 27°C schlüpfen die Larven normalerweise am 3 dpf. Die leichte Entwicklungsverzögerung von 1 dpf aller Embryonen wird daher auf die Raumtemperatur von 25-26°C zurückgeführt. Bei den niedrigeren Konzentrationen zwischen 1 und 15  $\mu$ M konnten keine phänotypischen Anomalitäten oder andere Abweichungen gegenüber der Negativkontrolle beobachtet werden (Tabelle 27). Ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M konnte ab dem 4 dpf bei den Zebrafischlarven eine Rückgratverkrümmung identifiziert werden.

Tabelle 27: *In vivo* Wirksamkeit von **Tivantinib (115)** auf die embryonale Entwicklung der Wildtyp Zebrafischlarven (*Danio Rerio wild*). (A) Kontrollembryo mit 2% DMSO. (B-F) Die Zebrafischembryonen wurden mit steigenden Konzentrationen von **Tivantinib (115)**-Lösungen behandelt (B) 1  $\mu$ M, (C) 15  $\mu$ M, (D) 30  $\mu$ M, (E) 45  $\mu$ M und (F) 60  $\mu$ M. Ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M (D-F) zeigt sich der charakteristische Phänotyp mit gekrümmten Rückgrat.



Durch die Beobachtung der phänotypischen Anomalität wird zum Einen die Permeabilität von **Tivantinib (115)** durch das Chorion und die Haut nachgewiesen und zum Anderen, dass **Tivantinib (115)** bereits in frühen Stadien die Embryonalentwicklung der Fische stört. In der embryonalen Entwicklung des Zebrafisches ist der Wnt-Signalweg für viele Vorgänge, wie beispielsweise die Ausbildung der Körperachse verantwortlich. Vor allem die GSK-3, aber auch die c-Met beeinflussen diesen Signalweg entscheidend. Dies korreliert auch mit den Beobachtungen, dass die Inhibition der GSK-3 aber auch der c-Met zu Entwicklungsstörungen der Zebrafischlarven führt. Allerdings wird durch die Inhibition beider Kinasen innerhalb der Zebrafischembryonen der gleiche charakteristische Phänotyp, ein gekrümmtes Rückgrat, ausgebildet. Dennoch wird der Phänotyp bereits ab einer Inhibitorkonzentration von 30  $\mu$ M beobachtet. **Tivantinib (115)** weist für c-Met jedoch einen viel höheren  $IC_{50}$ -Wert von 63  $\mu$ M auf, während der  $IC_{50}$  für die GSK-3 $\alpha$  mit 6.3  $\mu$ M und für die GSK-3 $\beta$  mit 32  $\mu$ M deutlich niedriger liegen. Aufgrund der niedrigen Aktivität von **Tivantinib (115)** gegenüber der c-Met wird davon ausgegangen, dass die beobachteten phänotypischen Anomalien bei Konzentrationen <60  $\mu$ M auf die Inhibition der GSK-3 $\alpha/\beta$  zurückzuführen sind.

Die Rückgratsverkrümmung der Embryonen wird vor allem durch die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin innerhalb des Wnt-Signalweges hervorgerufen. Die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin wird vor allem durch die Inhibition von GSK-3 $\beta$  verursacht.<sup>[314, 316]</sup> Die phänotypischen Veränderungen wurden ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M beobachtet, einer Konzentration bei der **Tivantinib (115)** nicht mehr  $\alpha$ -selektiv ist

---

und auch die GSK-3 $\beta$  inhibiert. Folglich wird angenommen, dass der beobachtete Phänotyp auf die Inhibition der GSK-3 $\beta$  zurückzuführen ist. Allerdings ist das durchgeführte Zebrafisch-Embryonen-Assays zu ungenau, um eine mögliche Isoform-Selektivität zwischen GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  eindeutig zu belegen.

### 3.5.3 Zusammenfassung und Ausblick: Tivantinib als GSK-3-Inhibitor

**Tivantinib (115)** zeigt im Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte eine höhere Aktivität gegenüber den beiden Isoformen der GSK-3 als gegenüber der c-Met. Außerdem bestätigte sich dabei die vermutete Selektivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$ .

Der Grund für die  $\alpha$ -Selektivität von **Tivantinib (115)** konnte aus den Dockinguntersuchungen von **Tivantinib (115)** im Homologiemodell der GSK-3 $\beta$  und der überlagerten Aminosäuresequenz der GSK-3 $\alpha$  nicht eindeutig erklärt werden. Dennoch wird auch im Fall des **Tivantinib (115)** den beiden Aminosäuren Arg148 (GSK-3 $\beta$ ) und Lys211 (GSK-3 $\alpha$ ) innerhalb der Arg-reichen Schleife eine Schlüsselfunktion für die Isoform-Selektivität zugeschrieben.

Im Phänotyp-basierten Zebrafischembryonen-Assay konnte bei **Tivantinib (115)** der für die GSK-3 $\beta$  Inhibition charakteristische Phänotyp eines gekrümmten Rückgrats ohne Letalität nachgewiesen werden. Eine c-Met Inhibition als Verursacher des Phänotyps konnte aufgrund der **Tivantinib (115)** Konzentration ausgeschlossen werden.

Derzeitig wird **Tivantinib (115)** in den AML-Zell-Assays aus Abschnitt 3.1.10 bei niedrigeren Konzentrationen getestet, um die  $\alpha$ -selektive Aktivität von **Tivantinib (115)** nachzuweisen und um **Tivantinib (115)** auf seine Wirkung gegenüber der AML zu untersuchen.

**Tivantinib (115)** befindet sich bereits in verschiedenen Phase III Studien und ist daher schon umfangreich auf Nebenwirkungen getestet worden. Somit könnte sich mit **Tivantinib (115)** eine neue und vielversprechende Therapiemöglichkeit für die Behandlung der AML eröffnen.



### 3.6 Einfluss der Konformation von Met45 auf die enzymatische Aktivität des Proteasoms

Die Inhalte dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht.<sup>[348]</sup>

**Autoren:** Dennis Bensinger, Theresa Neumann, Christoph Scholz, Constantin Voss, Sabine Knorr, Ulrike Kuckelkorn, Kay Hamacher, Peter M. Kloetzel, Boris Schmidt.

**Titel:** Elastase-like activity is dominant to Chymotrypsin-like activity in 20S Proteasome 's  $\beta 5$  catalytic subunit.

**Journal:** *ACS Chemical Biology* **2016**.

**DOI:** 10.1021/acscchembio.6b00023.

Mit freundlicher Genehmigung von *ACS Publications* [RightsLink® by Copyright Clearance Center]. Die folgende Nummerierung der Molekülstrukturen ist die gleiche wie in der Publikation.

#### Zusammenfassung

Im Vergleich zum nativen Proteasom zeigen röntgenkristallographische Kokristallstrukturen des Proteasoms mit Inhibitoren eine Konformationsänderung von Met45 innerhalb der  $\beta 5$ -Untereinheit. Dabei passt sich die S1-Tasche an den P1-Rest des Inhibitors an. Im Vergleich zu einem Diederwinkel von  $+48^\circ$  innerhalb des nativen Proteasoms (Abbildung 56, blau) besitzt Met45 im Fall des Inhibitor-Proteasom-Komplexes des aldehydischen Inhibitors **BSc2118** einen Diederwinkel von  $-167^\circ$  (Abbildung 56, grau in orange). Die gleiche Konformationsänderung findet sich bei einer Vielzahl an Inhibitoren mit P1-Resten, wie beispielsweise dem Ketoamid **BSc4999** ( $\alpha = -179^\circ$ , Abbildung 56 rot), dem Naturstoff **Syringolin A** ( $\alpha = -175^\circ$ ) oder der Boronsäure **Bortezomib** ( $\alpha = -174^\circ$ , Abbildung 56 grün). Wie das erst kürzlich beschriebene Indolo-Phakellin ( $\alpha = +51^\circ$ , Abbildung 56 lila) zeigt, verbleibt Met45 hingegen bei Inhibitoren, welche nicht die S1-Tasche besetzten, in der nativen Konformation.



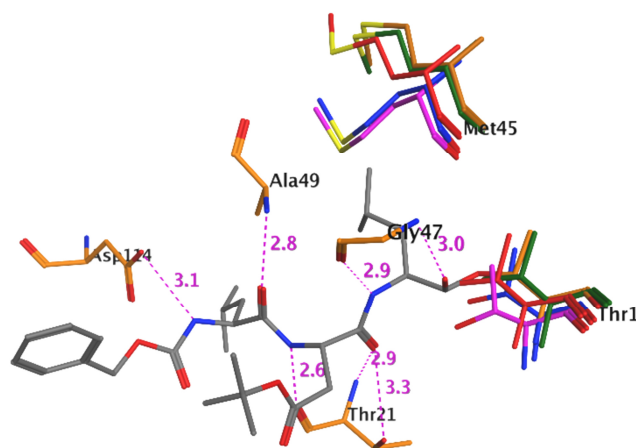


Abbildung 56: Die Strukturen des nativen Proteasoms ( $\alpha = +48^\circ$ , blau) und des **BSc2118**-Proteasom-Komplexes ( $\alpha = -167^\circ$ , grau in orange) beschreiben zwei unterschiedliche Konformationen der Seitenkette Met45. Zusätzlich sind die Konformationen der Schlüsselaminosäuren Met45 und Thr1 von Kokristallstrukturen mit peptidischen Inhibitoren, wie **Bortezomib** (grün) und **BSc4999** (rot) im Vergleich zu dem nicht-peptidischen Indolo-Phakellin Inhibitor (lila) dargestellt. Kopie aus *Bensinger et al., ACS Chem. Biol.* **2016**, DOI:10.1021/acschembio.6b00023.<sup>[348]</sup> Mit freundlicher Genehmigung von *ACS Publications* [RightsLink® by Copyright Clearance Center].

Aufgrund der beobachteten Konformationsänderung von Met45 wird angenommen, dass die Ligandenbindung und-abspaltung durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem P1-Substratrest und der sehr flexiblen Met45 Seitenkette beeinflusst werden. Dabei wird vermutet, dass ein konzertierter Mechanismus die Bindung von Substraten mit großen P1-Resten durch die Vergrößerung des Diederwinkels  $\alpha$  beschleunigt. Dieser *induced fit* soll eine Konformationsänderung des S1-Proteinrückgrats zur Folge haben, wodurch die Koordination des katalytischen Wassermoleküls verstärkt und dadurch die Nukleophilie von Thr10<sup>y</sup> erhöht wird. Diese Hypothese lässt sich mit dem Auslösen einer Mausefalle nachdem die Maus den Köder berührt hat verbildlichen (Abbildung 57b). Der Kontakt des Substrats zu Met45 löst die Konformationsänderung von Met45 aus. Bildlich entspricht dies dem Zuzuschnappen der Mausefalle ausgelöst durch den Kontakt der Maus zum Köder. Innerhalb dieses Projektes wurde diese Hypothese überprüft.

Moleküldynamiksimulationen (MD-Simulation) mit der Kristallstruktur des nativen Hefe-20S-Proteasoms und dem aldehydischen Inhibitor **BSc2118 (1)** sowie dessen Derivat mit einer Methyl-Gruppe als P1-Rest gaben Aufschluss über die Met45-Flexibilität in Abhängigkeit der Größe des P1-Rests (**BSc2118 (1)**: P1 = *t*Bu; **2**: P1 = Me) (Abbildung 57c). Die MD-Simulation des nativen Hefe-20S-Proteasoms ohne Ligand unterstützt mit einem RMSD (*root-mean-square deviation of atomic position*,

RMSD) im Bereich von 2 bis 6 Å die Annahme der hohen Flexibilität von Met45. Bei der MD-Simulation des Methyl-Derivats **2** konnte ein Wechsel zwischen zwei stabilen Zuständen identifiziert werden. Diese beiden Zustände können als die zwei verschiedenen Konformationen von Met45 innerhalb der Kokristallstrukturen interpretiert werden.

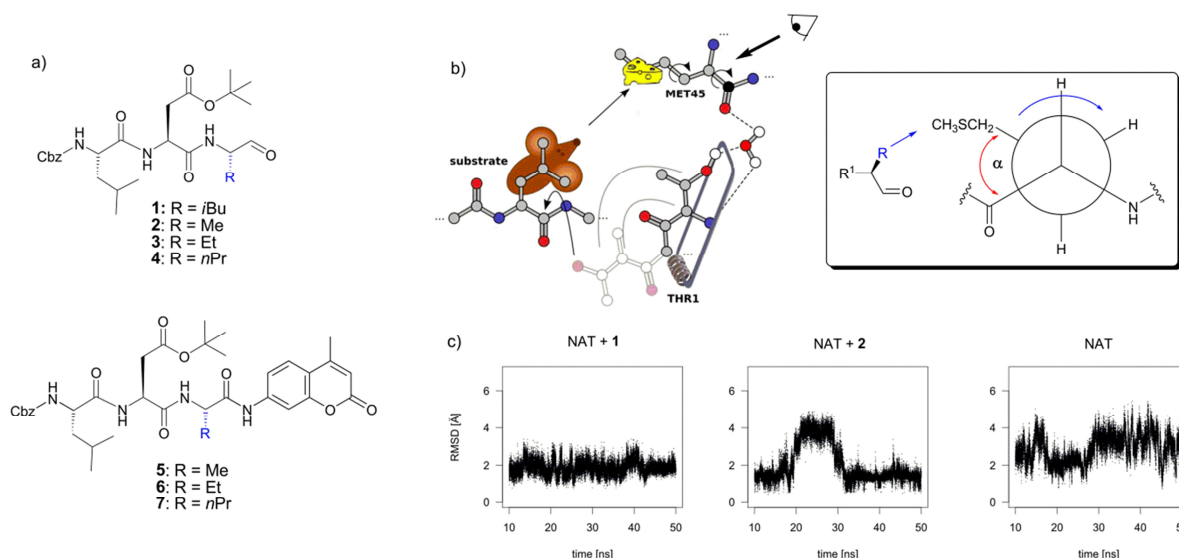


Abbildung 57: (a) Struktur von dem aldehydischen Inhibitors **BSc2118 (1)**, dessen Derivaten **2-4** mit schrittweise verlängerten P1-Resten (R) sowie von den zu den Inhibitoren strukturell analogen Substraten **5-7** mit fluoreszenter Aminocoumarin-Gruppe. (b) Schematische Darstellung des Mausefallen-artigen Liganden-Erkennungsmechanismus. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Met45 und dem P1-Rest des Liganden führen zu einer Konformationsänderung des Proteinrückgrats der S1-Tasche. (c) Moleküldynamiksimulationen der nativen β5-Untereinheit mit gebundenen Inhibitoren **BSc2118 (1)** (NAT + 1) und **2** (NAT + 2) sowie ohne gebundenen Liganden (NAT). Kopie aus *Bensinger et al., ACS Chem. Biol.* **2016**, DOI:10.1021/acschembio.6b00023.<sup>[348]</sup> Mit freundlicher Genehmigung von *ACS Publications* [RightsLink® by Copyright Clearance Center].

Basierend auf dem aldehydischen Inhibitor **BSc2118** wurden Derivate mit unterschiedlich langen P1-Resten (**2**: Me, **3**: Et und **4**: *n*-Pr) dargestellt (Abbildung 57a). Die *in vitro* Testung dieser Derivate auf ihre hemmende Wirkung gegenüber der β5-Untereinheit des Proteasoms zeigte einen Zusammenhang zwischen Größe des P1-Rests und der entsprechenden inhibitorischen Aktivität. Bei der Analyse der β5-spezifischen IC<sub>50</sub>-Werte kann eine kontinuierliche Zunahme der inhibitorischen Aktivität von P1 = Me über Et zu *n*-Pr beobachtet werden (Tabelle 28).

Tabelle 28: IC<sub>50</sub>-Werte von **BSc2118** und dessen Derivat **2-4** gegenüber der β5-Untereinheit des 20S-Proteasoms.

Verbindung	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>BSc2118 (1)</b>
IC <sub>50</sub> β5 [nM]	987	362	219	58

Die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte belegen, dass die Länge des P1-Rests einen direkten Einfluss auf den Diederwinkel  $\alpha$  von Met45 hat, da der Inhibitor durch einen großen P1-Rest eine bestimmte Rezeptorkonformation fixiert und somit die Inhibition gestärkt wird. Die Fixierung einer Rezeptorkonformation ist auch bei der MD-Simulation von **BSc2118** erkennbar (Abbildung 57c).

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, welchen Einfluss dieser Mechanismus auf die Substrathydrolyse hat. Die kinetischen Studien der Hydrolyse der Substrate **5-7** (Abbildung 57a) sowie des etablierten Referenzsubstrats Suc-LLVY-AMC erfolgten fluorimetrisch. Die verwendeten Substrate **5-7** waren strukturell analog zu den Inhibitoren mit unterschiedlich langen P1-Resten aufgebaut. Anstelle der Aldehyd-Funktion waren die Substrate jedoch mit einer fluoreszenten Aminocoumarin-Gruppe (AMC) versehen, welche während des Experiments hydrolytisch abgespalten wurde.

Für die Quantifizierung der Auswirkung einer Substrat-induzierten Verbreiterung des Diederwinkels  $\alpha$  auf die  $\beta 5$ -Aktivität wurden die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$ , die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$ , die Wechselzahl  $k_{cat}$ , und die spezifische Konstante ( $k_{cat}/K_M$ ) verwendet. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter erfolgte anhand eines doppeltreziproken Lineweaver-Burk-Diagramms (Abbildung 58).

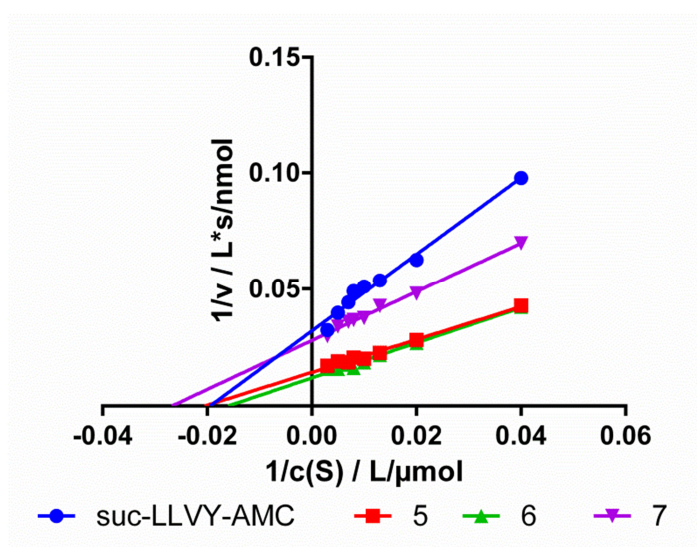


Abbildung 58: Doppeltreziproker Lineweaver-Burk-Plot der Substrate **5-7** und des Referenzsubstrates Suc-LLVY-AMC. Es wurden je zwei unabhängige Experimente in Quintuples durchgeführt ( $n = 10$ ). Kopie aus *Bensinger et al., ACS Chem. Biol.* **2016**, DOI:10.1021/acschembio.6b00023.<sup>[348]</sup> Mit freundlicher Genehmigung von ACS Publications [RightsLink® by Copyright Clearance Center].

Innerhalb des Lineweaver-Burk-Diagramms entspricht die Steigung der Geraden  $K_M/V_{\max}$ , der x-Achsenabschnitt dem negativen Kehrwert von  $K_M$  und der y-Achsenabschnitt dem Kehrwert von  $V_{\max}$ . Die  $K_M$ -Werte, welche die Affinität eines Substrates zum aktiven Zentrum beschreiben, liegen für alle vier Substrate in einer ähnlichen Größenordnung von 40-60  $\mu\text{M}$  (Tabelle 29). Folglich besitzen alle Substrate, obwohl sie von Methyl über Propyl zu Tyrosyl unterschiedlich große P1-Reste aufweisen, die gleiche Affinität zum aktiven Zentrum. Zwischen der P1-Länge und  $K_M$  besteht somit keine Korrelation. Dies wird auf die Flexibilität von Met45 zurückgeführt. Vermutlich kann aufgrund der Flexibilität eine perfekte S1-Tasche für eine Vielzahl an hydrophoben Resten geformt werden.

Tabelle 29: Aus dem Lineweaver-Burk-Plot ermittelte Michaelis-Menten-Parameter der Substrathydrolyse.

	5	6	7	Suc-LLVY-AMC
$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	45.1	61.7	39.4	49.7
$V_{\max}$ [nM/s]	70.8	85.3	37.8	31.5
$K_{\text{cat}}$ [1/s]	49.6	59.7	26.5	22.1
$K_{\text{cat}}/K_M$ [L/ $\mu\text{mol} \cdot \text{s}$ ]	1.1	1.0	0.7	0.4

Anhand der  $V_{\max}$ - und  $k_{\text{cat}}$ -Werte (Tabelle 29) zeigt sich, dass die Substrate 5 und 6 mit kleinen P1-Resten fast doppelt so schnell abgebaut wurden wie das Substrat 7 und das Referenzsubstrat Suc-LLVY-AMC mit voluminösen P1-Resten. Dieser Trend wird auch bei der Abnahme der spezifischen Konstante  $k_{\text{cat}}/K_M$  (Tabelle 29), welche die Substratpräferenz eines Enzyms widerspiegelt, beobachtet. Die Ergebnisse widersprechen somit der postulierten und bisher unbestrittenen ChTL Aktivität der  $\beta 5$ -Untereinheit. Entsprechend der ChTL Aktivität sollte die kinetische Aktivierung aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung zwischen Substrat und Met45, die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\max}$  mit wachsendem P1-Rest zunehmen. Diese ansteigende Aktivität wurde für die Inhibitoren 1-4 beobachtet. Folglich wurde auch erwartet, dass Substrate mit sterisch anspruchsvollen hydrophoben und aromatischen P1-Resten gegenüber dem Methyl-Substrat 5 präferiert werden. Um die katalytische Stelle schnellstmöglich zu erneuern, benötigen Substrate jedoch eine relativ hohe Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ). Es wird vermutet, dass die

---

großen P1-Reste in dem Mausefallenartigen Mechanismus gefangen sind und nur langsam umgesetzt werden. Die veränderte nicht-native Rezeptor-Konformation ( $\alpha = -174^\circ$ ) ist daher nur für Inhibitoren günstig. Für den Umsatz von Substraten ist hingegen die nahezu native Konformation ( $\alpha = 48^\circ$ ) bevorzugt. Die Substratpräferenz der  $\beta 5$ -Untereinheit entspricht anstatt der ChTL Aktivität eher einer „Kleine, neutrale Aminosäuren-bevorzugenden“ (*small neutral amino acid preferring*, SNAAP) oder Elastase-ähnlichen (*elastase-like*, EL) Aktivität. Folglich sollte die Substratpräferenz der  $\beta 5$ -Untereinheit reklassifiziert werden.

Die kürzlich veröffentlichte Struktur des murinen Immunoproteasoms ermöglicht eine Erklärung, warum die  $\beta 5$ -Untereinheit eine EL Aktivität aufweist. Die  $\beta 5$ -Untereinheit des Immunoproteasoms ( $\beta 5_i$ ) ist im Vergleich zu der konstitutiven  $\beta 5$ -Untereinheit ( $\beta 5_c$ ) strukturell verschieden. In der  $\beta 5_c$  ist die Met45 Seitenkette sehr flexibel und in Richtung des Substratbindungskanal gerichtet. In der  $\beta 5_i$  hingegen ist Met45 durch starke van-der Waals Wechselwirkungen in Richtung von Gln53 orientiert. In der  $\beta 5_c$  befindet sich anstelle des Gln53 ein Ser, welches nicht mit Met45 interagiert und somit die Orientierung nicht stabilisieren kann. Dies führt bei der  $\beta 5_c$  zu einer viel kleineren S1-Tasche als bei  $\beta 5_i$ . Aufgrund der Flexibilität von Met45 können Substrate mit großen P1-Resten zwar das aktive Zentrum erreichen, ihre Hydrolyse ist jedoch im Vergleich zu Substraten mit kleinen hydrophoben P1-Resten benachteiligt. Diese Diskriminierung lässt sich vermutlich durch die starke strukturelle Veränderung des Proteinrückgrats, welche für die Vergrößerung der S1-Tasche notwendig ist, erklären. Bei der Substrathydrolyse muss nach jeder Substratspaltung der Anfangszustand sehr schnell wieder hergestellt werden, weshalb eine schnelle und dynamische Veränderung des Proteins erforderlich ist.

Die reversible Bindung eines Inhibitors lässt sich durch das Gleichgewicht zwischen Assoziation ( $k_{on}$ ) und Dissoziation ( $k_{off}$ ) beschreiben. Die inverse Korrelation der Inhibitions- und Hydrolysestärke lässt sich aus folgendem Mechanismus ableiten. Bei der Mausefallenanalogie liegt sowohl eine gesteigerte Assoziationsrate („Köder“) als auch bei großen P1-Resten eine reduzierte Dissoziationsrate („Mausefalle“) vor. Die Verwendung dieses Mechanismus ist vor allem für irreversible und langsam reversible Inhibitoren nützlich und wurde unwissentlich bei dem Inhibitor **BSc2118** (1) ausgenutzt. Die Verlängerung der P1-Reste führt zu einer Zunahme der hydrophoben Wechselwirkungen mit der S1-Tasche. Dadurch wird sowohl die Inhibition als auch


die Substrataffinität, quantifiziert durch  $K_M$ , gestärkt. Aufgrund der Aktivierung der Mausefalle durch große P1-Reste ist die Substratdissoziation gehindert und führt zu einer niedrigeren Wechselzahl  $k_{cat}$ . Dies erklärt den experimentellen Befund, dass die hemmende Wirkung mit iterativ vergrößertem P1-Rest zunimmt, während die Geschwindigkeit der hydrolytischen Spaltung der entsprechenden Substrate abnimmt. Dies ist ein Beispiel, dass  $K_M$ -Werte alleine die Substratpräferenz nicht immer zutreffend beschreiben.

Das Lineweaver-Burk-Diagramm liefert noch eine weitere wichtige Beobachtung. Für das Propyl-Substrat **7** und noch stärker für das Referenzsubstrat Suc-LLVY-AMC zeigt sich eine leichte Abweichung von einem streng linearen Verhalten. Deshalb wurde vermutet, dass beide Substrate von noch mindestens einem weiteren aktiven Zentrum des Proteasoms hydrolysiert werden. In einem *Knockout*-Experiment, bei dem die  $\beta 5$ -Untereinheit selektiv ausgeschaltet wurde, wurde diese Annahme überprüft. **BSc2118 (1)** inhibiert selektiv die  $\beta 5$ -Untereinheit und wurde daher für das *Knockout*-Experiment verwendet. Dafür wurde das 20S Proteasom mit einer sehr hohen Konzentration von **BSc2118 (1)** (500nM, 10-fache Konzentration des  $IC_{50}$ -Wertes) inkubiert und anschließend die hydrolytische Aktivität gegenüber den Substraten **5-7** sowie Suc-LLVY-AMC gemessen.

Tabelle 30: Nach dem *Knockout* der  $\beta 5$ -Untereinheit verbleibende Hydrolyseaktivität des 20S Proteasoms gegenüber verschiedenen Substraten.

	5	6	7	Suc-LLVY-AMC
relative Aktivität bei 0.5 $\mu$ M BSc2118 [%]	0.5	0.4	1.2	12.0

Die hydrolytische Aktivität sank für die Substrate **5** und **6** mit kleinen P1-Resten drastisch auf  $\leq 0.5\%$ . Demzufolge werden die Substrate **5** und **6** ausschließlich von der  $\beta 5$ -Untereinheit gespalten. Substrat **7** zeigte nach dem  $\beta 5$  *Knockout* eine etwas höhere verbleibende hydrolytische Aktivität von 1.2%. Dies begründet die beobachtete leichte Abweichung von einem linearen Lineweaver-Burk-Plot. Überraschenderweise zeigte das Referenzsubstrat Suc-LLVY-AMC, welches in den meisten  $\beta 5$ -Aktivitätsassays verwendet wird, eine Restaktivität von beachtlichen 12%. Dies stimmt auch mit dem deutlich nicht-linearen Verhalten des Lineweaver-Burk-Plots



---

von Suc-LLVY-AMC überein. Dies stellt jedoch die weit verbreitete Anwendung von Suc-LLVY-AMC als Referenzsubstrat für die  $\beta$ 5-Untereinheit in Frage. Die unselektive Spaltung des etablierten Referenzsubstrats Suc-LLVY-AMC ist vor allem für Selektivitätsmessungen von Inhibitoren für die  $\beta$ 5-Untereinheit problematisch. Aus diesem Grund sollte das bisher gängige Referenzsubstrat Suc-LLVY-AMC durch Substrat **5**, Z-Leu-Asp(OtBu)-Ala-AMC, abgelöst werden.

Beitrag T. Neumann: Auswertung und Interpretation der Assay-Ergebnisse; Verfassen des Manuskriptes.



---

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

---

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Projekte erfolgreich bearbeitet. Die Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst und mögliche Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten vorgestellt.

### Isoform-selektive Inhibition der GSK-3

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Entwicklung von  $\alpha$ -selektiven Inhibitoren der GSK-3 zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML). Basierend auf dem im Arbeitskreis *Schmidt* entwickelten  $\alpha$ -selektiven, jedoch schlecht in Wasser löslichen GSK-3-Inhibitor **BSc4676 (33)**, wurde mithilfe von *in silico* Design eine Reihe verbesserter GSK-3-Inhibitoren konzipiert und anschließend erfolgreich synthetisiert. Die beste Verbindung (**BSc5090 (36)**) zeigt eine sehr gute inhibitorische Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  im niedrigen nanomolaren Bereich, mit der höchsten bisher bekannten GSK-3 $\alpha$  Selektivität sowie einer verbesserten Löslichkeit. Von den Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der isoform-selektiven Verbindungen sowie dem erstellten Homologiemodell der GSK-3 $\beta$  und der überlagerten Aminosäuresequenz der GSK-3 $\alpha$  wurde die Annahme abgeleitet, dass die Isoform-Selektivität der Inhibitoren aufgrund der beiden positionsgleichen, jedoch verschiedenartigen Aminosäuren, Arg148 (GSK-3 $\beta$ ) und Lys211 (GSK-3 $\alpha$ ), innerhalb der Arg-reichen Schleife hervorgerufen wird.

In Zusammenarbeit mit *Fish et al.* wurde in einem *Kinase Screening* die Selektivität von **BSc5090 (36)** gegenüber 50 humanen Kinasen getestet. **BSc5090 (36)** zeigte dabei keine hemmende Wirkung gegenüber 48 der 50 Kinasen. Lediglich die GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  waren die einzigen Kinasen, die zu 96% inhibiert wurden. Aufgrund der verbesserten Wasser-Löslichkeit konnte **BSc5090 (36)** auf seine *in vivo* Wirksamkeit und Toxizität in einem Phänotyp-basierten Zebrafischembryonen-Assay untersucht werden. Dabei konnte der charakteristische Phänotyp ohne Letalität nachgewiesen werden.

In Zusammenarbeit mit *Stegmaier et al.* wurde **BSc5090 (36)** in zwei AML-Zelllinien auf seine Wirkung untersucht. Die selektive GSK-3 $\alpha$  Hemmung durch **BSc5090 (36)** konnte in beiden AML-Zelllinien nachgewiesen werden. Dies führte zu einem starken Differenzierungsphänotyp der Zellen, erkennbar an morphologischen Veränderungen und der veränderten Expression bestimmter Oberflächenmarker. Die beobachtete



Abnahme der Koloniebildung der Zellen in Methylcellulose belegt zudem eine verminderte Proliferationsrate der Zellen. Die Beobachtungen entsprechen den Erwartungen der myeloischen Reifung. Folglich sind die zuvor entarteten AML-Zellen durch **BSc5090 (36)** in verschiedene gesunde Blutzellen differenziert. Die beobachtete Wirkung auf die AML-Zellen konnte zum ersten Mal mit einem niedermolekularen  $\alpha$ -selektiven Inhibitor erreicht werden und bestätigt die GSK-3 $\alpha$  als therapeutisches *Target* der AML. **BSc5090 (36)** ist somit nicht nur *in vitro* und *in vivo* aktiv, sondern zeigt auch eine vielversprechende Wirkung im Krankheitsmodell. Infolgedessen stellt die Inhibition der GSK-3 $\alpha$  mit **BSc5090 (36)** einen Ansatzpunkt für die Behandlung der AML dar.

**BSc5090 (36)** könnte aufgrund seiner hervorragenden Selektivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  in Zukunft auch als potentiell *screening tool* Anwendung finden. *Disney et al.* berichteten von Fluoreszenz-markiertem Staurosporin, welches in einem Fluoreszenzpolarisations-Bindungsassay für die Identifikation von PKA-selektiven Verbindungen genutzt werden kann.<sup>[349]</sup> In Anlehnung an *Disney et al.* wurde **116** konzipiert. Dabei soll über einen Glykol-Linker Fluorescein an den Amid-Substituenten von **BSc5090 (36)** angebracht werden (Abbildung 59). Die Glykol-verbückte Fluorescein-Gruppe sollte dabei die Aktivität und  $\alpha$ -Selektivität von **BSc5090 (36)** nicht beeinflussen, da es aus der ATP-Bindungstasche herausragen würde und die entscheidenden Interaktionen zwischen **BSc5090 (36)** und der GSK-3 $\alpha$  bestehen bleiben würden.

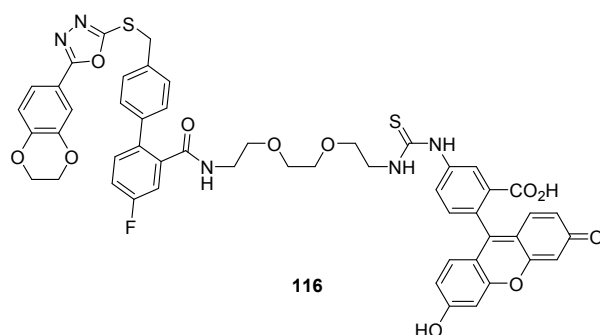


Abbildung 59: Mögliche Fluoreszenz-Markierung von **BSc5090 (36)**.

Der Inhibitor **116** könnte in einem Fluoreszenzpolarisations-Bindungsassay für das *Screening* für GSK-3 $\alpha$  selektiven Verbindungen verwendet werden. Die zu untersuchenden Verbindungen und **116** würden dabei um die Bindung an die GSK-3 $\alpha$

konkurrieren. Mithilfe der Fluoreszenzpolarisation könnte gemessen werden, ob **116** in Anwesenheit der zu untersuchenden Verbindung frei oder gebunden vorliegt.

In einem zweiten Projekt bezüglich der Entwicklung von GSK-3-Inhibitoren wurden in einem Liganden-basierten Ansatz neue Leitstrukturen für potentielle GSK-3-Inhibitoren konzipiert. Auf Basis von bekannten Kinase-Inhibitoren wurden privilegierte Molekülgrundgerüste identifiziert und neue Strukturideen abgeleitet. Anschließend wurden die neuen Verbindungen erfolgreich synthetisiert und *in vitro* auf ihre Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  getestet.

Einzig die beiden Pyrazol-Derivate **BSc5224 (93a)** und **BSc5231 (93b)** inhibieren die GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  sehr gut. Eine Isoform-Selektivität wird jedoch bei keiner der Verbindungen beobachtet.

Das Ziel zukünftiger Forschung sollte daher das Erlangen einer Isoform-Selektivität sein. Für nachfolgende Arbeiten scheint es sinnvoll **BSc5231 (93b)**, aufgrund der hohen Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ , als Ausgangspunkt für Optimierungen zu verwenden. Mögliche Strukturoptimierungen von **BSc5231 (93b)** hinsichtlich einer Isoform-Selektivität werden im Abschnitt 3.4.4 erläutert.

### Dual-selektive Inhibition der GSK-3 und *h*QC

Für die Behandlung der AD wurde in dieser Arbeit ein neuer potentieller Therapieansatz entworfen. Durch die gleichzeitige Inhibition der GSK-3 und *h*QC soll die Produktion des potentiell AD-verursachenden hyperphosphorylierten Taus sowie der AD-verursachenden pGlu-modifizierten A $\beta$ -Peptide verhindert werden. Aufbauend auf bekannte Inhibitoren der GSK-3 und *h*QC konnte, unterstützt durch Docking-Simulationen in das aktive Zentrum der GSK-3 $\beta$  und *h*QC, der dual-selektive Inhibitor **BSc5136 (73)** konzipiert und synthetisiert werden. Die anschließende *in vitro* Untersuchung zeigt eine schwach hemmende Wirkung gegenüber beiden Enzymen. Die inhibitorische Aktivität von **BSc5136 (73)** gegenüber der GSK-3 und der *h*QC ist noch deutlich zu verbessern. Mögliche Strukturmodifikationen von **BSc5136 (73)** für die Erhöhung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der GSK-3 und der *h*QC sind im Abschnitt 3.3.4 zu finden.

## Tivantinib als potentieller GSK-3-Inhibitor

Neue Beobachtungen legen nahe, dass die in verschiedenen klinischen Studien beobachtete Antitumor-Wirkung von **Tivantinib (115)** nicht durch die Hemmung von c-Met begründet sein kann. Dabei wurde die GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  als neues *Target* von **Tivantinib (115)** identifiziert. Daher wurde in dieser Arbeit **Tivantinib (115)** auf seine inhibitorische Aktivität gegenüber GSK-3 $\alpha/\beta$  sowie c-Met untersucht.


**Tivantinib (115)** zeigte im Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte eine höhere Aktivität gegenüber den beiden Isoformen der GSK-3 als gegenüber der c-Met. Außerdem bestätigte sich dabei die vermutete Selektivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$ . Mithilfe des Dockings von **Tivantinib (115)** im Homologiemodell der GSK-3 $\beta$  und der angepassten Aminosäuresequenz der GSK-3 $\alpha$  konnten erste Einblicke über die Wechselwirkungen zwischen **Tivantinib (115)** und den beiden Isoformen erlangt werden. Den innerhalb der Arg-reichen Schleife positionsgleichen Aminosäuren Arg148 (GSK-3 $\beta$ ) und Lys211 (GSK-3 $\alpha$ ) wird auch im Fall des **Tivantinib (115)** eine Schlüsselfunktion für die Isoform-Selektivität zugeschrieben.

Im Phänotyp-basierten Zebrafischembryonen-Assay konnte bei **Tivantinib (115)** der für die GSK-3 $\beta$  Inhibition charakteristische Phänotyp eines gekrümmten Rückgrats ohne Letalität nachgewiesen werden. Eine c-Met Inhibition als Verursacher des Phänotyps konnte ausgeschlossen werden.

Derzeitig wird **Tivantinib (115)** in AML-Zell-Assays getestet, um die  $\alpha$ -selektive Aktivität von **Tivantinib (115)** nachzuweisen und um **Tivantinib (115)** auf seine Wirkung gegenüber der AML zu untersuchen. Mit **Tivantinib (115)** könnte sich eine neue und vielversprechende Therapiemöglichkeit für die Behandlung der AML eröffnen.

## Liganden-Erkennung der katalytischen $\beta$ 5-Untereinheit des 20S-Proteasoms

Ein letztes Projekt dieser Arbeit untersuchte einen Liganden-Erkennungsmechanismus der  $\beta$ 5-Untereinheit des Proteasoms. Die ursprüngliche Hypothese, dass es durch Liganden-Erkennung zu einer Mausefallen-artigen Konformationsänderung von Met45 und daraufhin zur Veränderung des gesamten Proteinrückgrats innerhalb der  $\beta$ 5-Untereinheit kommt, konnte für Liganden mit großen P1-Resten bestätigt werden. Aufgrund dieses Mausefallen-artigen Mechanismus nimmt die hemmende Wirkung von Inhibitoren mit iterativ vergrößertem P1-Rest zu, während die Geschwindigkeit



---

der hydrolytischen Spaltung der entsprechenden Substrate abnimmt. Die Untersuchung der Substrathydrolyse nach dem Ausschalten der  $\beta$ 5-Aktivität zeigt ausschließlich für große P1-Reste eine signifikante Restaktivität des Proteasoms. Entgegen der in der Literatur postulierten ChTL Aktivität, spaltet die  $\beta$ 5-Untereinheit offensichtlich bevorzugt nach kleinen, neutralen Aminosäuren (SNAAP). Folglich sollte die Substratpräferenz der  $\beta$ 5-Untereinheit in Elastase-ähnlich (*elastase-like*, EL) reklassifiziert werden. Demzufolge sollten bei Aktivitätsbestimmungen der  $\beta$ 5-Untereinheit die bisherigen Standard-Referenzsubstrate mit großen P1-Resten durch Substrate mit kleinen, neutralen P1-Resten ersetzt werden.

---

## 5 Experimenteller Teil

---

### 5.1 Allgemeine Anmerkungen zu den Docking-Methoden

Im folgenden Abschnitt werden verschiedene Methoden des *Molecular Modelings* beschrieben. Sämtliche Arbeiten wurden mit der Software *Molecular Operating Environment (MOE) 2014.0901*<sup>[290]</sup> der *Chemical Computing Group* durchgeführt.

#### 5.1.1 Vorbereitung der röntgenkristallographischen Proteinstruktur der GSK-3 $\beta$

Für die Docking-Studien der GSK-3-Inhibitoren wurde die röntgenkristallographische Struktur der GSK-3 $\beta$  mit dem PDB Code 3F88 herangezogen. Dazu wurden alle in der Struktur enthaltenen Wassermoleküle sowie die B-Einheit der Dimer-Struktur gelöscht, sodass nur mit der A-Einheit weiter gearbeitet wurde. Im nächsten Schritt wurde die A-Einheit mit der Funktion *Protonate 3D* von *MOE 2014.0901* präpariert. Mit der Funktion *Protonate 3D* werden automatisch Wasserstoffatome an die röntgenkristallographische Struktur angebracht und geometrische Optimierungen sowie Energieminimierungen der Struktur durchgeführt.

#### 5.1.2 Erzeugung eines Pharmakophormodells basierend auf BSc4676

Für die Erstellung eines Pharmakophormodells wurde die Leitstruktur **BSc4676 (33)** herangezogen. Zuerst wurde **BSc4676 (33)** in die vorbereitete A-Einheit der GSK-3 $\beta$  gedockt. Dabei wurde das *Amber12:EHT* Kraftfeld zur Energieminimierung verwendet. Dieses ist für Proteine durch *Amber* und für kleine Moleküle durch die erweiterte 2D Hückel Theorie parametrisiert.<sup>[292, 350]</sup> 1000 Posen wurden generiert und durch die Scoring-Funktion *London dG* bewertet. Die erhaltenen 30 besten Posen wurden erneut mit der wissenbasierten *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion gescort, um die Pose mit der realitätsnächsten Bindungsgeometrie zu ermitteln.<sup>[293]</sup> Mithilfe der Anwendung *Pharmacophore Elucidation* wurden ausgehend von der daraus erhaltenen besten Pose Pharmacophordescriptoren erstellt. Dabei wurde ein Ph4-Modell erstellt, welches Descriptoren für einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor, drei aromatische Ringe und ein hydrophobes Zentrum enthält (siehe Abschnitt 3.1.2).

### 5.1.3 Protein/Liganden-Docking in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$ mit dem auf BSc4676 basierenden Pharmakophormodell

Ausgehend von BSc4676 (33) wurde eine Reihe an Leitstruktur-ähnlichen Molekülen entworfen. Die Strukturen wurden mit dem Formelzeichenprogramm *ChemBioDraw Ultra* (Version 13.0.2)<sup>[294]</sup> gezeichnet und in eine MOE Datenbank transferiert. Anschließend erfolgte ein Pharmakophor-basiertes Docking der Strukturen aus der generierten Datenbank in die ATP-Bindungstasche der zuvor präparierten A-Einheit der GSK-3 $\beta$ . Das Docking wurde mit rigidem Rezeptor und flexiblen Liganden mit dem *Amber12:EHT* Kraftfeld durchgeführt. Die erstellten Ligandenkonformationen wurden durch das zuvor erstellte Pharmakophor-Modell sowie dem *Triangle Matcher Placement* in die ATP-Bindungstasche plziert. Die generierten Posen wurden zunächst durch die Scoring-Funktion *London dG* bewertet. Die daraus resultierenden Posen wurden anschließend mit der wissenbasierten *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion<sup>[293]</sup> gescort, um die Pose mit der wahrscheinlichsten Bindungsgeometrie zu ermitteln.

### 5.1.4 Erzeugung eines Homologiemodells

Für die Erstellung einer homologen 3D-Struktur der GSK-3 $\alpha$  wurde die zuvor präparierten A-Einheit (siehe Abschnitt 5.1.1) der röntgenkristallographischen GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88) sowie die Aminosäuresequenz der humanen GSK-3 $\alpha$  (UniProtKB P49840) verwendet. Die Sequenzidentität zwischen GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  wurde durch MOE auf 86% berechnet.

	1	2
1: 3f88-ligx.p...		86.2
2: sp P49840 G...	85.7	

Abbildung 60: Identitätsmatrix: Anteil identischer Aminosäurereste der Sequenz von GSK-3 $\beta$  (1) und GSK-3 $\alpha$  (2).

Mithilfe der Funktion *Sequence Annotation* wurde die Sekundärstruktur der GSK-3 $\beta$  als Proteinkinase definiert. Mittels der Information über die Sekundärstruktur und der Aminosäuresequenz der GSK-3 $\alpha$  wurde mit der Funktion *Align* ein Homologie-Modell erstellt. Dabei diente wiederum *Amber12:EHT* als Kraftfeld.

### 5.1.5 Protein/Liganden-Docking von Tivantinib in das Homologiemodell der GSK-3 $\alpha$ / $\beta$

Das Docking wurde mit rigidem Rezeptor und flexiblen Liganden mit dem *Amber12:EHT* Kraftfeld durchgeführt. Die erstellten Ligandenkonformationen wurden durch das *Triangle Matcher Placement* in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  sowie des erzeugten Homologiemodells der GSK-3 $\alpha$  plaziert. Die generierten Posen wurden zunächst durch die Scoring-Funktion *London dG* bewertet. Anschließend wurde aus den 30 besten Konformationen die realitätsnächsten Bindungsgeometrien mittels der wissenbasierten DSX<sup>CSD</sup>-Funktion<sup>[293]</sup> ermittelt.

### 5.1.6 Protein/Liganden-Docking der neuen Leitstrukturen in ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$

Ausgehend von der zuvor präparierten A-Einheit der Kokristallstruktur der GSK-3 $\beta$  (PDB Code 3F88) wurden basierend auf den kokristallisierten Liganden mithilfe der Anwendung *Pharmacophore Elucidation* zwei Pharmacophordeskriptoren erstellt, welche einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor und einen aromatischen Ring umfassen (siehe Abschnitt 3.4.1). Anschließend erfolgte ein Pharmakophor-basiertes Docking der entworfenen neuen Leitstrukturen in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$ . Das Docking wurde mit rigidem Rezeptor und flexiblen Liganden mit dem *Amber12:EHT* Kraftfeld durchgeführt. Die erstellten Ligandenkonformationen wurden durch das zuvor erstellte Pharmakophor-Modell in das aktive Zentrum plaziert. Aus 1000 generierten Posen wurden zuerst durch die Scoring-Funktion *London dG* die 100 besten Posen ausgewählt. Anschließend wurde die erhaltenen Posen zur Verfeinerung durch die MOE-interne *GBVI/WSA dG* Scoring-Funktion erneut bewertet.

### 5.1.7 Protein/Liganden-Docking in das aktive Zentrum der hQC

Für das Docking der Strukturidee des dual-selektiven Inhibitors (**BSc5136 (73)**) wurde die röntgenkristallographische Struktur der hQC mit dem PDB Code 3si0 herangezogen. Mit der Funktion *Protonate 3D* von *MOE 2014.0901* wurden zuvor automatisch Wasserstoffatome an die röntgenkristallographische Struktur angebracht und geometrische Optimierungen sowie Energieminimierungen der Struktur durchgeführt. Ausgehend von der präparierten Kokristallstruktur wurden mithilfe der

Anwendung *Pharmacophore Elucidation* zwei Pharmacophordeskriptoren erstellt, welche einen Wasserstoffbrücke-Akzeptor und das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion umfassen (siehe Abschnitt 3.3.1). Anschließend erfolgte ein Pharmakophor-basiertes Docking der beiden Tautomere von **BSc5136 (73)** in das aktive Zentrum der zuvor präparierten Struktur der *hQC*. Das Docking wurde mit rigidem Rezeptor und flexiblen Liganden mit dem *Amber12:EHT* Kraftfeld durchgeführt. Die erstellten Ligandenkonformationen wurden durch das zuvor erstellte Pharmakophor-Modell sowie dem sogenannten *Triangle Matcher Placement* in das aktive Zentrum plazierte. Aus 1000 generierten Posen wurden durch die Scoring-Funktion *London dG* die 30 besten Posen herausgefiltert. Die daraus resultierenden Posen wurden danach nochmals mit der wissenbasierten *DSX<sup>CSD</sup>*-Funktion<sup>[293]</sup> gescort, um die Pose mit der wahrscheinlichsten Bindungsgeometrie zu ermitteln.

## 5.2 Allgemeine Anmerkungen zu den chemisch-synthetischen Arbeiten

### 5.2.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Die verwendeten Edukte und Reagenzien wurden in hoher Reinheit bei verschiedenen Anbietern (*Alpha Aesar*, *Acros Organics*, *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Merck*, *ABCR*, *TCI*, *VWR*, *Apollo Scientific*) gekauft und wie vom Hersteller dargeboten verwendet.

### 5.2.2 Reaktionsbedingungen

Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden unter Schutzgas-Atmosphäre durchgeführt. In den Synthesevorschriften wird darauf hingewiesen, falls unter Schutzgas-Atmosphäre gearbeitet wurde. Als Schutzgas kam Argon der Qualität 4.8 zum Einsatz. Die hierfür verwendeten Glasgeräte wurden zuvor ausgeheizt und mit Argon gespült.

Reaktionen in der Mikrowelle wurden in dem Gerät *Initiator* (300 W) der Firma *Biotage* durchgeführt.

### 5.2.3 Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Zur dünn-schichtchromatographischen Untersuchung wurden DC-Aluminiumplatten (Kieselgel 60 F254), der Firma *Merck*, verwendet. Die Chromatogramme wurden mit



Kammersättigung erstellt. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sowie 366 nm eingesetzt.

Zur säulenchromatographischen Trennung und Reinigung wurde als stationäre Phase Kieselgel 60 (15 – 40  $\mu\text{m}$ ), der Firma *Merck*, verwendet. Die Trennung erfolgte bei RT. Die automatische Flash Chromatographie erfolgte am Flashchromatograph *CombiFlash® Rf 4x* der Firma *Teledyne Technologies Inc.* bei RT. Als stationäre Phase wurden entweder *Telos Flash Silica* oder *Telos Flash reversed phase C18* Säulen der Packungsgrößen 4 g oder 12 g eingesetzt. Die automatische Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 214 nm, 254 nm oder 280 nm.

#### 5.2.4 HPLC-Untersuchungen

Zur chromatographischen Analyse der Reaktionsprodukte wurde der Hochleistungsflüssigkeitschromatograph *Agilent 1100*, der Firma *Agilent Technologies*, herangezogen. Es wurde folgende Säule verwendet: *Reversed phase, Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A*, 4.6x150 mm. Als Standardmethode wurde ein MeCN/Wasser Laufmittelgradient (70% Wasser; 30% MeCN (0 bis 1 min) auf 90% MeCN) mit einer Flussrate von 1 mL/min und einer Laufzeit von 12 min verwendet. Die Wellenlängendetektion erfolgte mit einem variablen Wellenlängendetektor (*variable wavelength detector*, VWD) bei  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

#### 5.2.5 NMR-Spektroskopie

Die Messungen der NMR-Spektren wurden entweder an einem *Bruker DRX 500*, bei Resonanzfrequenzen von 500 MHz für  $^1\text{H}$ - und 125 MHz für  $^{13}\text{C}$ -Messungen, oder an einem *Bruker AC 300*, bei Resonanzfrequenzen von 300 MHz für  $^1\text{H}$ - und 75 MHz für  $^{13}\text{C}$ -Messungen, durchgeführt. Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit Hilfe der Software *MestReNova* der Firma *Mestrelab Research*. Das jeweils verwendete Lösungsmittel, die Messfrequenz und die Messtemperatur sind den spektroskopischen Daten in Klammern vorangestellt. Die Werte der chemischen Verschiebung  $\delta$  sind in *parts per million* (ppm) angegeben und beziehen sich auf das Signal von Tetramethylsilan bei 0 ppm. Als Lösungsmittel wurde entweder deuteriertes Chloroform oder DMSO verwendet. Wenn kein Tetramethylsilan zugesetzt war, wurden die NMR-Spektren am Signal des eingesetzten Lösungsmittels kalibriert:



DMSO-d<sub>6</sub> ( $\delta_{(\text{CHD}_2)\text{SO}(\text{CD}_3)} = 2.50 \text{ ppm}$ ,  $\delta_{(\text{CD}_3)\text{SO}(\text{CD}_3)} = 39.52 \text{ ppm}$ ).

Die Feinstrukturen der Protonen-Signale sind mit folgenden Abkürzungen gekennzeichnet: s für Singulett, d für Dublett, dd für Doppeldublett, ddd für Dreifachduplett, dddd für Vierfachduplett, td für Triplet vom Duplett, dtd für Duplett vom Triplet vom Duplett, t für Triplet, dt für Doppeltriplett und m für Multiplet.

### 5.2.6 Massenspektrometrie

Die Messungen der EI-Massenspektren (*electron ionization*, EI) erfolgten an einem *Finnigan MAT 95* doppelt fokussierenden Massenspektrometer. Die Messungen der ESI-Massenspektren (*electrospray ionization*, ESI) erfolgten an einem *Esquire LC* Massenspektrometer mit einer Quadrupol-Ionenfalle als Analysator. Die detektierten Ionenmassen  $m/z$  werden in u angegeben. Die relativen Signalintensitäten sind in Prozent in Klammern, bezogen auf den Basis-Peak (100 %), angegeben.

### 5.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

Die folgenden AAVs werden bei mehreren Synthesen angewendet. Gegebenenfalls auftretende Abweichungen werden bei den Synthesevorschriften angegeben.

#### 5.3.1 AAV I: Suzuki Kupplungsreaktion

Das entsprechende Arylbromid (1.00 eq) wird unter Argon in Toluol/EtOH (1:1, getrocknet, 3 mL / 100 mg) gelöst. Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (0.03 eq) und eine 2 N wässrige Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (1.75 mL / 100 mg) werden hinzugegeben. Das entstandene zwei-phasige Reaktionsgemisch wird bei RT für 15 min gerührt. Im Anschluss wird die entsprechende Boronsäure (1.20 eq) unter Argonatmosphäre hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 80°C unter Rückflusskühlung für 2 d gerührt und anschließend auf RT gebracht. Das Reaktionsgemisch wird mit 10 mL H<sub>2</sub>O versetzt und die wässrige Phase dreimal mit je 10 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM unter Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt per Säulenchromatographie mit einer Lösungsmittelmischung aus Cyclohexan/EtOAc oder DCM/MeOH.

### 5.3.2 AAV II: Radikalische Bromierung mit NBS

Das entsprechende Toluol-Derivat (1.00 eq) wird in Tetrachlormethan (3 mL / 100 mg) gelöst. NBS (0.95 eq) und AIBN (5 mg per mmol) werden portionsweise über einen Zeitraum von 1 h bei RT zu der klaren Lösung hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 75°C unter Rückflusskühlung erhitzt und per HPLC und DC verfolgt. Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und das LM im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit 10 mL H<sub>2</sub>O versetzt und dreimal mit je 10 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird per Säulenchromatographie mit einer Lösungsmittelmischung aus Cyclohexan/EtOAc gereinigt.

### 5.3.3 AAV III: Bromierung von Benzylalkoholen

Zu einer Lösung des entsprechenden Benzylalkohols (2.50 eq) in Toluol (getrocknet, 5 mL / 100 mg) wird Phosphortribromid (1.00 eq) unter Argon hinzuge tropft. Der Reaktionsansatz wird bei 110°C unter Rückflusskühlung für 3 h gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und das LM im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktionsstufe weiter umgesetzt.

### 5.3.4 AAV IV: Nukleophile Substitution zur Darstellung der Thioether

Zu einer Lösung des entsprechenden Thiols (1.00 eq) in DMF (1 mL / 25 mg) wird eine 4 N NaOH-Lösung (1 mL / 100 mg) hinzuge tropft und die Lösung bei RT für 15 min gerührt. Anschließend wird das entsprechende Benzylbromid (1.25 eq) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei RT für weitere 6 h gerührt, wobei ein Niederschlag entsteht. Der entstandene Niederschlag wird abgefiltert und mit wenig DMF sowie mehrmals mit kaltem EtOH gewaschen. Der erhaltene Feststoff wird im Vakuum getrocknet.

Fällt das Reaktionsprodukt nicht in DMF aus, wird wie folgt vorgegangen.

Das Reaktionsgemisch wird zuerst mit EtOAc versetzt und mehrmals mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird entweder per

Säulenchromatographie mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan/EtOAc oder mit Hilfe der automatisierten Flash Chromatographie mit einer *reversed phase* C18 Säule (*Telos*) und einem Lösungsmittelgradient aus MeCN/H<sub>2</sub>O gereinigt.

### 5.3.5 AAV V: Nukleophile Substitution zur Darstellung der N-verbrückten Pyrazol-pyrimidine

Zu einer Lösung aus 2,4-Dichlorpyrimidin (1.00 eq) in DMSO (1 mL / 100 mg) wird das entsprechende Aminopyrazol (1.00 eq) und DIPEA (1.54 eq) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 60°C für 24 h gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und langsam auf Eiswasser gegeben. Die entstandene Suspension wird im Kühlschrank bei 7°C für weitere 2 h gekühlt. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet.

### 5.3.6 AAV VI: Säurekatalysierte nukleophile Substitution zur Darstellung der Anilinpyrimidine

Das entsprechende Pyrimidin-Derivat (1.00 eq) wird in *n*-BuOH (1.6 mL / 100 mg) gelöst. Das entsprechende Anilin (1.00 eq) und konzentrierte Salzsäure (0.02 mL / 100 mg) werden hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 100°C für 24 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung im Kühlschrank auf 7°C für 24 h gekühlt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und mit Cyclohexan und wenig DCM gewaschen.

## 5.4 Synthesevorschriften der GSK-3-Inhibitoren und deren Zwischenstufen

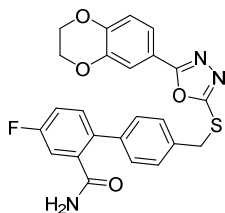
### 5.4.1 Bereits bekannte GSK-3-Inhibitoren und deren Zwischenstufen

Der GSK-3-Inhibitor **BSc4676 (33)** [4'-(((5-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio)methyl)-4-fluor-[1,1'-biphenyl]-2-carbonitril] und dessen Zwischenstufen wurden nach der Literaturvorschrift von *Lo Monte et al.*<sup>[289]</sup> synthetisiert.

Folgende Zwischenstufen von **BSc4676 (33)** wurden in den Synthesen der neuen GSK-3-Inhibitoren eingesetzt:

- 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**39**).
- 4'-(Brommethyl)-4-fluor-[1,1'-biphenyl]-2-carbonitril (**43a**).

**4'-((5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl-thio)methyl)-4-fluorobiphenyl-2-carboxamid (BSc5090 (36)).**



**C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: 463.48 g/mol.**

In einem ausgeheizten mikrowelleneigneten Gefäß wird **BSc4676 (33)** (50 mg, 0.11 mmol, 1.00 Äq.) eingewogen und für 5 min mit Argon gespült. Der Feststoff wird durch Zugabe von Trifluoressigsäure (0.8 mL) und konzentrierter Schwefelsäure (0.2 mL) gelöst und bei 70°C für 6 h gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und langsam auf 50 mL eines Eis/Wassergemisch gegeben. Die farblose wässrige Phase wird dreimal mit je 10 mL DCM extrahiert. Die vereinigte organische Phase wird mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM unter Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird per Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 1:2) gereinigt.

**Ausbeute:** 40 mg (78%) von **BSc5090 (36)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 6.93 min (96%).

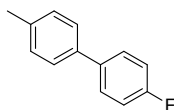
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.32 (td,  $J$  = 5.2 Hz,  $J$  = 3.7 Hz, 4H), 4.60 (s, 2H), 7.05 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.25 (dd,  $J$  = 9.1 Hz,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 7.31 (td,  $J$  = 8.6 Hz,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 7.38 (m, 3H), 7.41 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 7.45 (dd,  $J$  = 8.4 Hz,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.49 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 35.6, 64.1, 64.4, 114.3 (d,  $J_{C-F}$  = 21 Hz), 115.0, 115.9 (d,  $J_{C-F}$  = 21 Hz), 115.9, 118.1, 120.0, 128.6 (2C), 128.8 (2C), 132.0 (d,  $J_{C-F}$  = 8 Hz), 134.8, 135.5, 138.9, 139.0 (d,  $J_{C-F}$  = 7 Hz), 143.8, 146.7, 160.9 (d,  $J_{C-F}$  = 247 Hz), 162.7, 164.9, 169.5.

**EI-MS:**  $m/z$  = 463 (100, [M<sup>+</sup>]), 464 (26, [M<sup>+</sup> + H]), 465 (7, [M<sup>+</sup> + 2H]).

## 5.4.2 Synthese von BSc5137 (34b)

### 4-Fluor-4'-methyl-1,1'-biphenyl (44b).



**C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>F: 186.23 g/mol.**

Nach AAV I wird 1-Brom-4-fluorbenzol (**46b**) (100 mg, 0.57 mmol, 1.00 eq) mit *p*-Tolylboronsäure (**45**) (93 mg, 0.69 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (18 mg, 0.02 mmol, 0.03 eq) und 1.75 mL 2 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung in 3.0 mL Toluol/EtOH umgesetzt.

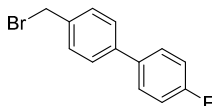
**Ausbeute:** 155 mg (99%) von **44b** als farbloser Feststoff.

**HPLC:** *t<sub>R</sub>* = 8.12 min (97%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):** δ (ppm) = 2.34 (s, 3H), 7.26 (m, 4H), 7.53 (d, *J* = 8.07 Hz, 2H), 7.66 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):** δ (ppm) = 20.6, 115.6 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 19 Hz, 2C), 126.4 (2C), 128.3 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 8 Hz, 2C), 129.5 (2C), 136.2, 136.5 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 3 Hz), 136.6, 161.6, (d, *J*<sub>C-F</sub> = 242 Hz).

### 4-(Brommethyl)-4'-fluor-1,1'-biphenyl (43b).



**C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>BrF: 265.13 g/mol.**

Nach AAV II wird 4-Fluor-4'-methyl-1,1'-biphenyl (**44b**) (106 mg, 0.57 mmol, 1.00 eq) mit NBS (97 mg, 0.54 mmol, 0.95 eq) und AIBN (3 mg) in 3 mL Tetrachlormethan umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 11:1) gereinigt.

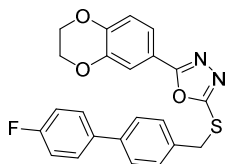
**Ausbeute:** 105 mg (69%) von **43b** als farbloser Feststoff.

**HPLC:** *t<sub>R</sub>* = 8.39 min (87%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):** δ (ppm) = 4.76 (s, 2H), 7.29 (m, 2H), 7.53 (m, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.72 (m, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K): δ (ppm) = 34.2, 115.6, 115.8, 126.9 (2C), 128.6, 128.7, 129.9 (2C), 136.0 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 2 Hz), 137.1, 139.0, 162.0 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 245 Hz).

**2-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-(((4'-fluor-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)-thio)-1,3,4-oxadiazol (BSc5137 (34b)).**



**C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 420.23 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (50 mg, 0.21 mmol, 1.00 eq) mit 4-(Brommethyl)-4'-fluor-1,1'-biphenyl (**43b**) (85 mg, 0.32 mmol, 1.52 eq) und 0.5 mL 4 N NaOH-Lösung in 3 mL DMF umgesetzt. Das Produkt wird als farbloser Niederschlag abfiltriert.

**Ausbeute:** 43 mg (48%) von **BSc5137 (34b)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 8.72 min (99%).

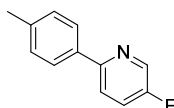
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) = 4.32 (m, 4H), 4.60 (s, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.4, 1H), 7.27 (td, *J* = 6.7 Hz, 3.4 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 8.4 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.69 (m, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K): δ (ppm) = 35.6, 64.0, 64.4, 115.0, 115.6, 115.7, 115.9, 118.1, 119.9, 126.8 (2C), 128.5, 128.6, 129.6 (2C), 135.9, 136.0, 138.5, 143.8, 146.7, 161.9 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 245 Hz, 1C), 162.5, 164.9.

**EI-MS:** *m/z* (%): 420 (16, [M<sup>+</sup>]), 421 (5, [M<sup>+</sup> + H]).

### 5.4.3 Synthese von BSc5133 (34c)

**5-Fluor-2-(*p*-tolyl)pyridin (44c).**



**C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>FN: 187.22 g/mol.**

Nach AAV I wird 2-Brom-5-fluorpyridin (**46c**) (100 mg, 0.57 mmol, 1.00 eq) mit *p*-Tolylboronsäure (**45**) (93 mg, 0.68 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)-

palladium(0) (20 mg, 0.02 mmol, 0.03 eq) und 1.75 mL 2 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung in 3.0 mL Toluol/EtOH umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 10:1) gereinigt.

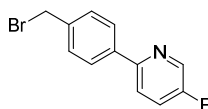
**Ausbeute:** 71 mg (67%) von **44c** als beiger Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 6.17 min (98%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 2.35 (s, 3H), 7.29 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 7.78 (td,  $J$  = 8.8 Hz,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.99 (dd,  $J$  = 8.9 Hz,  $J$  = 4.4 Hz, 1H), 8.62 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 20.7, 121.2 (d,  $J_{C-F}$  = 4 Hz), 124.0 (d,  $J_{C-F}$  = 18 Hz), 126.3 (2C), 129.3 (2C), 135.0, 137.2 (d,  $J_{C-F}$  = 24 Hz), 138.4, 152.7 (d,  $J_{C-F}$  = 3 Hz), 158.4 (d,  $J_{C-F}$  = 254 Hz).

### 2-(4-(Brommethyl)phenyl)-5-fluorpyridin (**43c**).



**C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>BrFN:** 266.11 g/mol.

Nach AAV II wird 5-Fluor-2-(*p*-tolyl)pyridin (**44c**) (77 mg, 0.41 mmol, 1.00 eq) mit NBS (70 mg, 0.39 mmol, 0.95 eq) und AIBN (2 mg) in 3 mL Tetrachlormethan umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 5:1) gereinigt.

**Ausbeute:** 71 mg (65%) von **43c** als farbloser Feststoff.

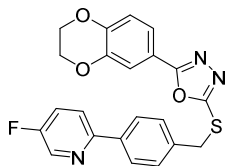
**HPLC:**  $t_R$  = 7.15 min (61%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.67 (s, 2H), 7.55 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.82 (dd,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 8.03 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 8.03 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 8.66 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 34.5, 122.2, 124.6 (d,  $J_{C-F}$  = 24 Hz), 127.2, 127.8, 130.2, 132.7, 138.0 (d,  $J_{C-F}$  = 24 Hz), 139.2, 152.6, 159.1 (d,  $J_{C-F}$  = 245 Hz).



**2-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-(4-(5-fluoropyridin-2-yl)benzylthio)-1,3,4-oxadiazol (BSc5133 (34c)).**



**C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S: 421.45 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (60 mg, 0.25 mmol, 1.00 eq) mit 2-(4-(Brommethyl)phenyl)-5-fluorpyridin (**43c**) (94 mg, 0.36 mmol, 1.40 eq) und 0.6 mL 4 N NaOH-Lösung in 1 mL DMF umgesetzt. Das Produkt wird als farbloser Niederschlag abfiltriert.

**Ausbeute:** 69 mg (66%) von **BSc5133 (34c)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 8.09 min (96%).

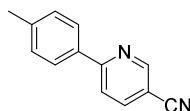
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.31 (dd,  $J$  = 12.6 Hz,  $J$  = 5.0 Hz 4H), 4.61 (s, 2H), 7.04 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.57 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.80 (td,  $J$  = 8.7 Hz,  $J$  = 2.9 Hz, 1H), 8.05 (m, 3H), 8.63 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 35.6, 64.1, 64.4, 115.1, 115.9, 118.1, 119.9, 121.7 (d,  $J_{C-F}$  = 5 Hz), 124.1 (d,  $J_{C-F}$  = 18 Hz), 126.6 (2C), 129.5 (2C), 137.1, 137.3, 137.5 (d,  $J_{C-F}$  = 6 Hz), 143.8, 146.7, 152.2 (d,  $J_{C-F}$  = 4 Hz), 158.6 (d,  $J_{C-F}$  = 254 Hz), 162.5, 165.0.

**EI-MS:**  $m/z$  (%): 421 (20, [M<sup>+</sup>]), 422 (4, [M<sup>+</sup> + H]).

#### 5.4.4 Synthese von BSc5132 (34d)

**6-(*p*-Tolyl)nicotinonitril (44d).**



**C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>: 194.24 g/mol.**

Nach AAV I wird 2-Brom-5-cyanopyridin (**46d**) (100 mg, 0.55 mmol, 1.00 eq) mit *p*-Tolylboronsäure (**45**) (89 mg, 0.66 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (20 mg, 0.02 mmol, 0.03 eq) und 1.75 mL 2 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung in 3.0 mL Toluol/EtOH umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 8:1) gereinigt.

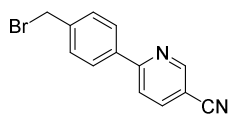
**Ausbeute:** 90 mg (85%) von **44d** als beiger Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 6.77$  min (96%).

**$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 2.38 (s, 3H), 7.35 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 8.08 (m, 2H), 8.16 (dd,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 8.34 (dd,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 9.06 (dd,  $J = 2.2$  Hz,  $J = 0.8$  Hz, 1H).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 20.9, 107.0, 117.3, 119.7, 127.1 (2C), 129.6 (2C), 134.2, 140.5, 140.8, 152.4, 159.1.

**6-(4-(Brommethyl)phenyl)nicotinonitril (43d).**



**$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{BrN}_2$ : 273.13 g/mol.**

Nach AAV II wird 6-(*p*-Tolyl)nicotinonitril (**44d**) (82 mg, 0.42 mmol, 1.00 eq) mit NBS (71 mg, 0.40 mmol, 0.95 eq) und AIBN (2 mg) in 3 mL Tetrachlormethan umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 5:1) gereinigt.

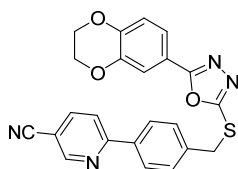
**Ausbeute:** 94 mg (82%) von **43d** als hellgelber Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 7.26$  min (73%).

**$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.78 (s, 2H), 7.61 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.78 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.20 (m, 1H), 9.11 (m, 1H).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 34.2, 108.0, 117.6, 121.0, 128.2, 130.4, 132.9, 141.5, 144.5, 153.2, 158.4.

**6-(4-((5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio)methyl)-phenyl)-nicotinonitril (BSc5132 (34d)).**



**$\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ : 428.47 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (46 mg, 0.20 mmol, 1.00 eq) mit 6-(4-(Brommethyl)phenyl)nicotinonitril (**43d**)

(80 mg, 0.29 mmol, 1.50 eq) und 0.5 mL 4 N NaOH-Lösung in 3 mL DMF umgesetzt. Das Produkt wird als farbloser Niederschlag abfiltriert.

**Ausbeute:** 43 mg (51%) von **BSc5132 (34d)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 7.89$  min (95%).

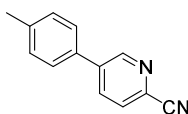
**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.31 (dtd,  $J = 2.1$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 4.3 Hz, 4H), 4.63 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.38 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J = 2.1$  Hz,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.14 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.18 (dd,  $J = 0.6$  Hz,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.37 (dd,  $J = 2.2$  Hz,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 9.07 (dd,  $J = 0.6$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 35.6, 64.0, 64.4, 107.4, 115.0, 115.9, 117.2, 118.1, 119.9, 120.2, 127.4 (2C), 127.9 (2C), 136.3, 139.4, 140.9, 143.8, 146.7, 152.5, 158.6, 162.4, 164.6.

**EI-MS:**  $m/z$  (%): 428 (38,  $[\text{M}^+]$ ).

#### 5.4.5 Synthese von **BSc5216 (34e)**

**5-(*p*-Tolyl)picolinonitril (44e).**



**$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2$ :** 194.24 g/mol.

Nach AAV IV wird 5-Brom-2-pyridincarbonitril (**46e**) (200 mg, 1.09 mmol, 1.00 eq) mit *p*-Tolylboronsäure (**45**) (178 mg, 1.31 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (38 mg, 0.03 mmol, 0.03 eq) und 1.75 mL 2 N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung in 3.0 mL Toluol/EtOH umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 6:1) gereinigt.

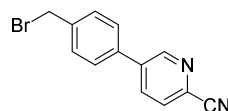
**Ausbeute:** 160 mg (75%) von **44e** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 6.71$  min (96%).

**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 2.37 (s, 3H), 7.35 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 7.73 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 8.08 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 8.31 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 9.07 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 20.8, 117.7, 127.2 (2C), 129.1, 129.9 (2C), 130.8, 132.3, 134.9, 138.9, 139.2, 149.0.

### 5-(4-(Brommethyl)phenyl)picolinonitril (**43e**).



**C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>2</sub>: 273.13 g/mol.**

Nach AAV II wird 5-(*p*-Tolyl)picolinonitril (**44e**) (150 mg, 0.77 mmol, 1.00 eq) mit NBS (130 mg, 0.73 mmol, 0.95 eq) und AIBN (4 mg) in 6 mL Tetrachlormethan umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 5:1) gereinigt.

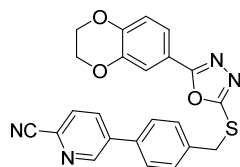
**Ausbeute:** 135 mg (64%) von **43e** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 7.17 min (96%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.78 (s, 2H), 7.62 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.84 (m, 2H), 8.12 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 8.36 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 2.3 Hz, 1H), 9.11 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 33.7, 117.6, 127.7 (2C), 129.8, 130.2 (2C), 131.3, 135.1, 135.4, 138.4, 139.3, 149.3.

### 5-(4-(((5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio)methyl)phenyl) picolinonitril (BSc5216 (**34e**)).



**C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S: 428.47 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (71 mg, 0.30 mmol, 1.00 eq) mit 5-(4-(Brommethyl)phenyl)picolinonitril (**43e**) (123 mg, 0.45 mmol, 1.50 eq) und 0.7 mL 4 N NaOH-Lösung in 3 mL DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wird als farbloser Niederschlag abfiltriert und anschließend mittels automatisierter Flash Chromatographie (*reversed phase* C18, MeCN/H<sub>2</sub>O) gereinigt.

**Ausbeute:** 74 mg (58%) von **BSc5216 (34e)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 8.02 min (99%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.32 (dtd,  $J$  = 7.3 Hz,  $J$  = 3.5 Hz,  $J$  = 2.1 Hz, 4H), 4.63 (s, 2H), 7.04 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.38 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J$  = 8.4 Hz,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.64 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.82 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H),

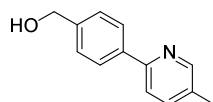
8.11 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 8.33 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 9.09 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 35.5, 64.1, 64.4, 115.1, 155.9, 117.6, 118.2, 119.9, 127.5 (2C), 129.1, 130.0 (2C), 131.2, 134.6, 135.3, 138.3, 138.4, 143.8, 146.7, 149.2, 162.5, 165.0.

EI-MS:  $m/z$  (%): 428 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 429 (28,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 430 (8,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

#### 5.4.6 Synthese von BSc5185 (34f)

##### (4-(5-Methylpyridin-2-yl)phenyl)methanol (48f).



$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}$ : 199.25 g/mol.

Nach AAV I wird 2-Brom-5-methylpyridin (46f) (500 mg, 2.91 mmol, 1.00 eq) mit 4-(Hydroxymethyl)Phenylboronsäure (47) (530 mg, 3.49 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (100 mg, 0.09 mmol, 0.03 eq) und 8.75 mL 2 N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung in 15.0 mL Toluol/EtOH umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, DCM/MeOH 30:1) gereinigt.

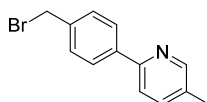
Ausbeute: 359 mg (62%) von 48f als farbloser Feststoff.

HPLC:  $t_R = 0.83$  min (99%).

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.33 (s, 3H), 4.55 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 5.21 (t,  $J = 5.7$  Hz, OH), 7.41 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.67 (m, 1H), 7.83 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 8.01 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 8.48 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 17.6, 62.6, 119.4, 125.9 (2C), 126.7 (2C), 131.5, 137.1, 137.4, 1143.1, 149.7, 153.3.

##### 2-(4-(Bromomethyl)phenyl)-5-methylpyridin (43f).



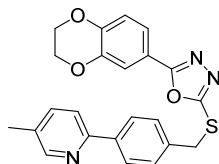
$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{BrN}$ : 262.15 g/mol.

Nach AAV III wird (4-(5-Methylpyridin-2-yl)phenyl)methanol (48f) (135 mg, 0.68 mmol, 2.50 eq) mit Phosphortribromid (73 mg, 0.27 mmol, 1.00 eq) in 10 mL

Toluol umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

HPLC:  $t_R = 2.77$  min (56%).

**2-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-(4-(5-methylpyridin-2-yl)benzylthio)-1,3,4-oxadiazol (BSc5185 (34f)).**



**C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S: 417.48 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (43 mg, 0.18 mmol, 1.00 eq) mit 2-(4-(Brommethyl)phenyl)-5-methylpyridin (**43f**) (71 mg, 0.27 mmol, 1.50 eq) und 0.7 mL 4 N NaOH-Lösung in 2 mL DMF umgesetzt. Nach der Extraktion des Rohproduktes aus der Reaktionslösung wird dieses mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 2:1) gereinigt.

**Ausbeute:** 20 mg (27%) von **BSc5185 (34f)** als farbloser Feststoff.

HPLC:  $t_R = 5.26$  min (98%).

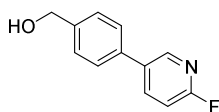
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 2.33 (s, 3H), 4.32 (ddd,  $J = 5.2$  Hz,  $J = 4.5$  Hz,  $J = 1.6$  Hz, 4H), 4.61 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.40 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.56 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.68 (dd,  $J = 8.2$  Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.84 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 8.02 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 8.49 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 17.6, 35.8, 64.0, 64.4, 115.0, 115.9, 118.1, 119.6, 119.9, 126.4 (2C), 129.4 (2C), 131.9, 137.1, 137.5, 138.1, 143.8, 146.7, 149.7, 152.8, 162.5, 164.9.

**EI-MS:**  $m/z$  (%): 417 (32, [M<sup>+</sup>]).

#### 5.4.7 Synthese von BSc5215 (34g)

##### (4-(6-Fluorpyridin-3-yl)phenyl)methanol (48g).



**C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>FN**O: 203.22 g/mol.

Nach AAV I wird 5-Brom-2-fluorpyridin (**46g**) (200 mg, 1.14 mmol, 1.00 eq) mit 4-(Hydroxymethyl)Phenylboronsäure (**47**) (207 mg, 1.36 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (39 mg, 0.03 mmol, 0.03 eq) und 2.5 mL 2 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung in 4.0 mL Toluol/EtOH umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 1:2) gereinigt.

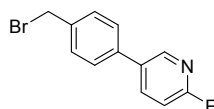
**Ausbeute:** 62 mg (27%) von **48g** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 3.55$  min (99%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.61 (s, 2H), 6.96 (dd,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.40 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.45 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.93 (ddd,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 2.6$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 8.31 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 63.0, 108.9 (d,  $J_{C-F} = 36$  Hz), 126.2 (2C), 126.9 (2C), 134.1 (d,  $J_{C-F} = 4$  Hz), 134.4, 139.1 (d,  $J_{C-F} = 7$  Hz), 141.7, 144.8 (d,  $J_{C-F} = 15$  Hz), 162.4 (d,  $J_{C-F} = 239$  Hz).

##### 5-(4-(Bromomethyl)phenyl)-2-fluorpyridin (43g).

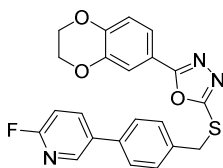


**C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>BrFN**: 266.11 g/mol.

Nach AAV III wird (4-(6-Fluorpyridin-3-yl)phenyl)methanol (**48g**) (60 mg, 0.30 mmol, 2.50 eq) mit Phosphortribromid (32 mg, 0.12 mmol, 1.00 eq) in 4 mL Toluol umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

**HPLC:**  $t_R = 7.23$  min (72%).

**2-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-((4-(6-fluoropyridin-3-yl)benzyl)thio)-1,3,4-oxadiazol (BSc5215 (34g)).**



**C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S: 421.45 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (46 mg, 0.20 mmol, 1.00 eq) mit 5-(4-(Brommethyl)phenyl)-2-fluorpyridin (**43g**) (78 mg, 0.30 mmol, 1.50 eq) und 0.4 mL 4 N NaOH-Lösung in 1 mL DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wird als beiger Niederschlag abgefiltert und anschließend schrittweise mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 2:1) und automatisierter Flash Chromatographie (*reversed phase* C18, MeCN/H<sub>2</sub>O) gereinigt.

**Ausbeute:** 48 mg (58%) von **BSc5215 (34g)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 8.10 min (98%).

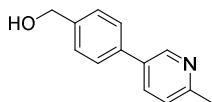
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.32 (m, 4H), 4.61 (s, 2H), 7.04 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.27 (dd,  $J$  = 8.5 Hz,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 7.38 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.59 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.70 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 8.27 (td,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 8.53 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 35.6, 64.1, 64.4, 109.6 (d,  $J_{C-F}$  = 37 Hz), 115.1, 115.9, 118.1, 119.9, 127.0 (2C), 129.8 (2C), 133.6 (d,  $J_{C-F}$  = 4 Hz), 135.2 (d,  $J_{C-F}$  = 4 Hz), 136.9, 140.3 (d,  $J_{C-F}$  = 9 Hz), 143.8, 145.4 (d,  $J_{C-F}$  = 16 Hz), 146.7, 162.5, 162.7 (d,  $J_{C-F}$  = 263 Hz), 165.0.

**EI-MS:**  $m/z$  (%): 421 (100, [M<sup>+</sup>]), 422 (26, [M<sup>+</sup> + H]), 423 (8, [M<sup>+</sup> + 2H]).

#### 5.4.8 Synthese von BSc5186 (34h)

**(4-(6-Methylpyridin-3-yl)phenyl)methanol (48h).**



**C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO: 199.25 g/mol.**

Nach AAV I wird 5-Brom-2-methylpyridin (**46h**) (500 mg, 2.91 mmol, 1.00 eq) mit 4-(Hydroxymethyl)Phenylboronsäure (**47**) (530 mg, 3.49 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (100 mg, 0.09 mmol, 0.03 eq) und 8.75 mL 2 N



Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung in 15.0 mL Toluol/EtOH umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, DCM/MeOH 20:1) gereinigt.

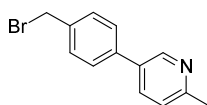
**Ausbeute:** 301 mg (52%) von **48h** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 0.81 min (93%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 2.50 (s, 3H), 4.54 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H), 5.23 (t,  $J$  = 5.7 Hz, OH), 7.32 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.42 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.65 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 7.94 (dd,  $J$  = 8.1 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 8.73 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 23.6, 62.6, 123.1, 126.3 (2C), 127.1 (2C), 132.6, 134.2, 135.5, 142.2, 146.7, 156.7.

### 5-(4-(Bromomethyl)phenyl)-2-methylpyridin (**43h**).

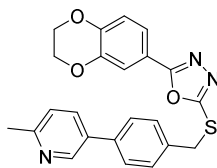


**C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>BrN:** 262.15 g/mol.

Nach AAV III wird (4-(6-Methylpyridin-3-yl)phenyl)methanol (**48h**) (200 mg, 1.00 mmol, 2.50 eq) mit Phosphortribromid (109 mg, 0.40 mmol, 1.00 eq) in 10 mL Toluol umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

**HPLC:**  $t_R$  = 2.94 min (72%).

### 2-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-(4-(6-methylpyridin-3-yl)benzylthio)-1,3,4-oxadiazol (**BSc5186 (34h)**).



**C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S:** 417.48 g/mol.

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (63 mg, 0.27 mmol, 1.00 eq) mit 5-(4-(Bromomethyl)phenyl)-2-methylpyridin (**43h**) (105 mg, 0.40 mmol, 1.50 eq) und 1 mL 4 N NaOH-Lösung in 3 mL DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wird als farbloser Niederschlag abfiltriert und anschließend mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 1:1) gereinigt.

**Ausbeute:** 13 mg (12%) von **BSc5186 (34h)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 5.17$  min (97%).

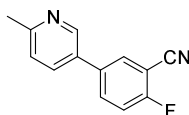
**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) =  $\text{CH}_3$  fehlt, 4.32 (m, 4H), 4.61 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.39 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.57 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.66 – 7.69 (m, 2H), 7.95 (dd,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 8.73 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 24.1, 36.1, 64.6, 64.9, 114.9, 115.6, 116.4, 118.6, 120.4, 123.6, 127.2, 130.2, 132.6, 134.8, 136.9, 137.0, 144.3, 147.2, 157.4, 163.1, 165.5.

**EI-MS:**  $m/z$  (%): 417 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 418 (26,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 419 (8,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

#### 5.4.9 Synthese von **BSc5131 (35a)**

##### 2-Fluor-5-(6-methylpyridin-3-yl)benzonitril (**51a**).



**$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FN}_2$ :** 212.23 g/mol.

Nach AAV I wird 5-Brom-2-methylpyridin (**49a**) (100 mg, 0.58 mmol, 1.00 eq) mit 3-Cyano-4-fluorphenylboronsäure (**50a**) (162 mg, 0.70 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (19 mg, 0.02 mmol, 0.03 eq) und 1.75 mL 2 N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung in 3.0 mL Toluol/EtOH umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 1:1) gereinigt.

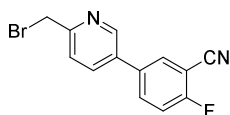
**Ausbeute:** 103 mg (84%) von **51a** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 1.75$  min (99%).

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 2.75 (s, 3H), 7.36 (t,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.41 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.81 (dd,  $J = 11.9$  Hz,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 7.91 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 8.73 (s, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 23.0, 102.9 (d,  $J_{\text{C-F}} = 17$  Hz), 113.5, 117.7 (d,  $J_{\text{C-F}} = 23$  Hz), 124.9, 132.0, 132.1, 133.7 (d,  $J_{\text{C-F}} = 8$  Hz), 134.2, 137.0, 145.0, 157.4, 163.3 (d,  $J_{\text{C-F}} = 263$  Hz).

### 5-(6-(Brommethyl)pyridin-3-yl)-2-fluorbenzonitril (**52a**).



**C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>BrFN<sub>2</sub>: 291.12 g/mol.**

Nach AAV II wird 2-Fluor-5-(6-methylpyridin-3-yl)benzonitril (**51a**) (70 mg, 0.33 mmol, 1.00 eq) mit NBS (59 mg, 0.33 mmol, 1.00 eq) und AIBN (2 mg) in 3 mL Tetrachlormethan umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 3:1) gereinigt.

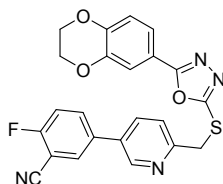
**Ausbeute:** 21 mg (22%) von **52a** als hellgelber Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 6.77 min (85%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.70 (d,  $J$  = 63.6 Hz, 2H), 7.36 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.61 (dd,  $J$  = 20.0 Hz,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.85 (m, 3H), 8.75 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 29.9, 113.5, 117.7 (d,  $J_{C-F}$  = 21 Hz), 124.1, 132.2, 133.3, 133.8 (d,  $J_{C-F}$  = 8 Hz), 134.6 (d,  $J_{C-F}$  = 4 Hz), 136.0, 147.4, 156.8, 163.3 (d,  $J_{C-F}$  = 251 Hz).

### 2-(6-((5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio)methyl)-pyridin-3-yl)-5-fluorbenzonitril (BSc5131 (**35a**)).



**C<sub>23</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S: 446.46 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (16 mg, 0.07 mmol, 1.00 eq) mit 5-(6-(Brommethyl)pyridin-3-yl)-2-fluorbenzonitril (**52a**) (30 mg, 0.10 mmol, 1.50 eq) und 0.2 mL 4 N NaOH-Lösung in 1 mL DMF umgesetzt. Das Produkt wird als farbloser Niederschlag abfiltriert.

**Ausbeute:** 10 mg (33%) von **BSc5131 (35a)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 7.32 min (98%).

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.31 (dddd,  $J$  = 6.8 Hz,  $J$  = 5.0 Hz,  $J$  = 3.4 Hz,  $J$  = 1.6 Hz, 4H), 5.03 (s, 2H), 6.95 (m, 1H), 7.46 (dd,  $J$  = 2.0 Hz,

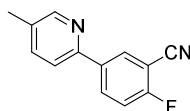
$J = 6.9$  Hz, 3H), 7.85 (ddd,  $J = 12.3$  Hz,  $J = 4.7$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 8.32 (m, 2H), 8.87 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 29.9, 64.4, 64.8, 102.5 (d,  $J_{\text{C-F}} = 6$  Hz), 114.4, 116.1, 116.1, 117.7 (d,  $J_{\text{C-F}} = 29$  Hz), 118.3, 120.6, 122.9, 128.4, 131.2, 132.4 (d,  $J_{\text{C-F}} = 7$  Hz), 133.8 (d,  $J_{\text{C-F}} = 8$  Hz), 134.0, 138.4, 144.1, 144.4, 149.8, 151.8, 155.4, 157.8 (d,  $J_{\text{C-F}} = 254$  Hz), 165.0.

EI-MS:  $m/z = 463$  (100,  $[\text{M}^+]$ ), 464 (26,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 465 (7,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

#### 5.4.10 Synthese von BSc5217 (35b)

##### 2-Fluor-5-(5-methylpyridin-2-yl)benzonitril (51b).



$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FN}_2$ : 212.23 g/mol.

Nach AAV I wird 2-Brom-5-methylpyridin (**49b**) (200 mg, 1.16 mmol, 1.00 eq) mit 3-Cyano-4-fluorphenylboronsäure (**50b**) (324 mg, 1.40 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (38 mg, 0.03 mmol, 0.03 eq) und 2.50 mL 2 N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung in 4.0 mL Toluol/EtOH umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 5:1) gereinigt.

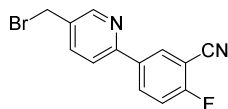
**Ausbeute:** 224 mg (91%) von **51b** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 2.61$  min (91%).

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.34 (s, 3H), 7.61 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J = 8.6$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 8.46 (ddd,  $J = 8.8$  Hz, 5.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 8.52 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.54 (dd,  $J = 6.3$  Hz, 2.4 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 17.6, 100.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 16$  Hz), 113.9, 116.9 (d,  $J_{\text{C-F}} = 21$  Hz), 119.9, 131.3, 132.9, 133.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 8$  Hz), 136.1 (d,  $J_{\text{C-F}} = 4$  Hz), 137.8, 149.9, 150.3, 162.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 257$  Hz).

### 5-(5-(Brommethyl)pyridin-2-yl)-2-fluorbenzonitril (**52b**).



**C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>BrFN<sub>2</sub>: 291.12 g/mol.**

Nach AAV II wird 2-Fluor-5-(5-methylpyridin-2-yl)benzonitril (**51b**) (200 mg, 0.94 mmol, 1.00 eq) mit NBS (159 mg, 0.90 mmol, 0.95 eq) und AIBN (5 mg) in 8 mL Tetrachlormethan umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 7:1) gereinigt.

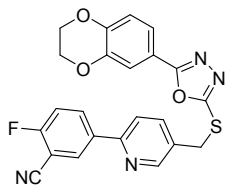
**Ausbeute:** 107 mg (39%) von **52b** als beiger Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 6.77 min (85%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.80 (s, 2H), 7.65 (t,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 2.3 Hz, 1H), 8.08 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 8.50 (ddd,  $J$  = 8.7 Hz, 5.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 8.59 (dd,  $J$  = 6.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 8.76 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 30.6, 100.8 (d,  $J_{C-F}$  = 25 Hz), 113.9, 117.1 (d,  $J_{C-F}$  = 15 Hz), 120.5, 131.9, 133.8, 134.1 (d,  $J_{C-F}$  = 15 Hz), 135.5, 138.3, 150.1, 152.7, 162.9 (d,  $J_{C-F}$  = 256 Hz).

### 5-(5-(((5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio)methyl)-pyridin-2-yl)-2-fluorbenzonitril (BSc5217 (**35b**)).



**C<sub>23</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S: 446.46 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (50 mg, 0.21 mmol, 1.00 eq) mit 5-(5-(Brommethyl)pyridin-2-yl)-2-fluorbenzonitril (**52b**) (93 mg, 0.32 mmol, 1.50 eq) und 0.5 mL 4 N NaOH-Lösung in 2 mL DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wird als farbloser Niederschlag abfiltriert und anschließend zweimal mittels automatisierter Flash Chromatographie (*reversed phase* C18, MeCN/H<sub>2</sub>O) gereinigt.

**Ausbeute:** 35 mg (37%) von BSc5217 (**35b**) als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 7.58 min (99%).

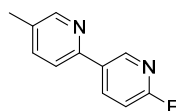
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):** δ (ppm) = 4.32 (m, 4H), 4.64 (s, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 8.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.65 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.03 (dd, *J* = 8.3 Hz, 2.2 Hz, 1H), 8.07 (dd, *J* = 8.2 Hz, 0.5 Hz, 1H), 8.48 (ddd, *J* = 8.9 Hz, 5.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 8.58 (dd, *J* = 6.2 Hz, 2.3 Hz, 1H), 8.77 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):** δ (ppm) = 32.8, 64.1, 64.4, 95.2, 113.9, 115.1, 115.8, 117.0, 117.1, 118.1, 119.9, 120.3, 131.8, 132.8, 134.0 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 8 Hz), 136.1, 138.0, 143.8, 146.7, 150.0, 152.2, 156.7, 163.6 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 356 Hz).

**EI-MS:** *m/z* (%): 446 (100, [M<sup>+</sup>]), 447 (27, [M<sup>+</sup> + H]), 448 (8, [M<sup>+</sup> + 2H]).

#### 5.4.11 Synthese von BSc5218 (35c)

##### 6'-Fluor-5-methyl-2,3'-bipyridin (51c).



**C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>: 188.21 g/mol.**

Nach AAV I wird 2-Brom-5-methylpyridin (**49c**) (200 mg, 1.163 mmol, 1.00 eq) mit 2-Fluorpyridin-5-boronsäure (**50c**) (196 mg, 1.40 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (38 mg, 0.03 mmol, 0.03 eq) und 1.75 mL 2 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung in 3.0 mL Toluol/EtOH umgesetzt.

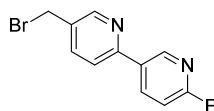
**Ausbeute:** 238 mg (99%) von **51c** als orangener Feststoff.

**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 1.31 min (92%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):** δ (ppm) = 2.35 (s, 3H), 7.28 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.7 Hz, 1H), 7.74 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 2.2 Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.53 (dd, *J* = 1.5 Hz, 0.7 Hz, 1H), 8.59 (m, 1H), 8.88 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):** δ (ppm) = 17.5, 109.5 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 36 Hz), 119.5, 128.7 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 10 Hz), 131.4 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 16 Hz), 132.7, 132.8 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 4 Hz), 137.7, 139.8 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 8 Hz), 145.5 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 16 Hz), 150.0, 163.2 (d, *J*<sub>C-F</sub> = 237 Hz).

### 5-(Brommethyl)-6'-fluor-2,3'-bipyridin (**52c**).



**C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>BrFN<sub>2</sub>: 267.10 g/mol.**

Nach AAV II wird 6'-Fluor-5-methyl-2,3'-bipyridin (**51c**) (219 mg, 1.16 mmol, 1.00 eq) mit NBS (197 mg, 1.11 mmol, 0.95 eq) und AIBN (6 mg) in 10 mL Tetrachlormethan umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 4:1) gereinigt.

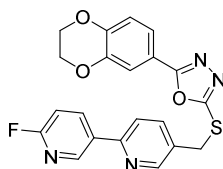
**Ausbeute:** 139 mg (45%) von **52c** als orangener Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 4.92 min (76%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.80 (s, 2H), 7.31 (dd,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 2.9 Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 8.05 (dd,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 0.7 Hz, 1H), 8.63 (m, 1H), 8.76 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.92 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 30.6, 109.7, 120.5, 132.8, 133.6, 138.2, 140.3, 146.1, 149.9, 150.1, 163.5 (d,  $J_{C-F}$  = 245 Hz).

### 2-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-(((6'-fluor-[2,3'-bipyridin]-5-yl)methyl)-thio)-1,3,4-oxadiazol (**BSc5218 (35c)**).



**C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S: 422.43 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (75 mg, 0.32 mmol, 1.00 eq) mit 5-(Brommethyl)-6'-fluor-2,3'-bipyridin (**152c**) (127 mg, 0.48 mmol, 1.50 eq) und 0.75 mL 4 N NaOH-Lösung in 3 mL DMF umgesetzt. Das Rohprodukt wird als hellgelber Niederschlag abfiltriert.

**Ausbeute:** 41 mg (31%) von **BSc5218 (35c)** als hellgelber Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 6.69 min (95%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.31 (dtd,  $J$  = 7.3 Hz,  $J$  = 3.6 Hz, 2.1 Hz, 4H), 4.64 (s, 2H), 7.04 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J$  = 8.6 Hz,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 7.37 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J$  = 8.5 Hz,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 8.01 – 8.05 (m,

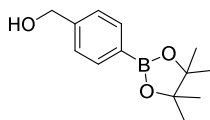
2H), 8.61 (td,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 8.77 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.90 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 32.8, 64.0, 64.4, 109.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 39$  Hz), 115.1, 115.8, 118.1, 119.9, 120.3, 132.4 (d,  $J_{\text{C-F}} = 7$  Hz), 132.5, 137.9, 140.2 (d,  $J_{\text{C-F}} = 9$  Hz), 143.8, 145.8, 145.9, 146.7, 150.1, 151.9, 162.4, 163.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 356$  Hz).

EI-MS:  $m/z$  (%): 422 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 423 (36,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 424 (11,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

#### 5.4.12 Synthese der Tetrazol-Zwischenstufen

##### (4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)methanol (**58**).



$\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{O}_3\text{S}$ : 422.43 g/mol.

(4-(Hydroxymethyl)phenyl)boronsäure (**47**) (300 mg, 1.97 mmol, 1.00 eq) und Pinakol (**59**) (230 mg, 1.97 mmol, 1.00 eq) werden in 13 mL THF gelöst. Das Reaktionsgemisch wird bei 67°C für 24 h unter Rückflusskühlung gerührt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird mittel Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 1:4) gereinigt.

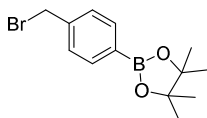
**Ausbeute:** 440 mg (95%) von **58** als farbloses Öl.

**HPLC:**  $t_R = 4.63$  min (99%).

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 1.29 (s, 12H), 4.52 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 5.22 (t,  $J = 5.7$  Hz, OH), 7.32 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.63 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 24.7 (4C), 62.7, 83.5 (2C), 125.7 (2C), 134.2 (2C), 146.0.

##### 2-(4-(Bromomethyl)phenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan (**57**).



$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{BBrO}_2$ : 297.00 g/mol.

Nach AAV IV wird (4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)methanol (**58**) (230 mg, 0.98 mmol, 2.50 eq) mit Phosphortribromid (106 mg, 0.39 mmol,



1.00 eq) in 7 mL Toluol umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

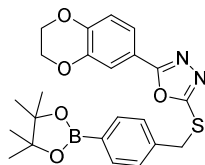
**Ausbeute:** 202 mg (72%) von **57** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 7.95 min (94%).

**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 1.29 (s, 12H), 4.70 (s, 2H), 7.45 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.66 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 24.6 (4C), 34.1, 83.7 (2C), 118.3, 128.7 (2C), 134.7 (2C), 141.2.

**2-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)thio)-1,3,4-oxadiazol (55).**



**$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{BN}_2\text{O}_5\text{S}$ : 452.33 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (300 mg, 1.27 mmol, 1.00 eq) mit 2-(4-(Brommethyl)phenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan (**57**) (573 mg, 1.93 mmol, 1.50 eq) und 3 mL 4 N NaOH-Lösung in 12 mL DMF umgesetzt. Nach der Extraktion des Rohproduktes aus der Reaktionslösung wird dieses mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 4:1) gereinigt.

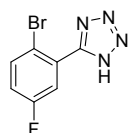
**Ausbeute:** 372 mg (65%) von **55** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 8.60 min (81%).

**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 1.27 (s, 12H), 4.04 (m, 4H), 4.56 (s, 2H), 7.04 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.38 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.42 (dd,  $J$  = 2.1 Hz,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.47 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.63 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 24.6 (4C), 35.9, 64.1, 64.4, 83.7 (2C), 115.0, 115.9, 118.1, 119.9, 125.7, 128.5 (2C), 134.6 (2C), 140.1, 143.8, 146.7, 162.4, 164.9.

### 5-(2-Brom-5-fluorphenyl)-1H-tetrazol (56).



**C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>BrFN<sub>4</sub>: 243.04 g/mol.**

Zu einer Lösung aus 2-Brom-5-fluorbenzonitril (**46a**) (335 mg, 1.68 mmol, 1.00 eq) in 3 mL DMF werden Natriumazid (117 mg, 2.18 mmol, 1.30 eq), Ammoniumchlorid (142 mg, 2.18 mmol, 1.30 eq) und Lithiumchlorid (92 mg, 2.18 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird bei 100°C für 16 h gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und mit 2 mL H<sub>2</sub>O versetzt. Mit einer 10%-igen NaOH-Lösung wird der pH-Wert auf 10 eingestellt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 10 mL EtOAc extrahiert. Danach wird der pH-Wert der wässrigen Phase mit konzentrierter Salzsäure auf 2 eingestellt. Der dabei entstandene Niederschlag wird abfiltriert und zweimal mit je 5 mL Wasser gewaschen. Das erhaltene Feststoff wird im Vakuum getrocknet.

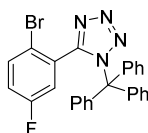
**Ausbeute:** 149 mg (37%) von **56** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 3.17$  min (65%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 7.46 (m, 1H), 7.68 (dd,  $J = 3.1$  Hz,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.91 (dd,  $J = 5.2$  Hz,  $J = 9.0$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 116.6 (d,  $J_{C-F} = 3$  Hz), 119.0 (d,  $J_{C-F} = 24$  Hz), 119.8 (d,  $J_{C-F} = 24$  Hz), 128.4 (d,  $J_{C-F} = 11$  Hz), 135.5 (d,  $J_{C-F} = 8$  Hz), 154.3, 161.0 (d,  $J_{C-F} = 243$  Hz).

### 5-(2-Brom-5-fluorphenyl)-1-trityl-1H-tetrazol (54).



**C<sub>26</sub>H<sub>18</sub>BrFN<sub>4</sub>: 485.36 g/mol.**

Zu einer auf 0°C abgekühlten Lösung aus 5-(2-Brom-5-fluorphenyl)-1H-tetrazol (**56**) (95 mg, 0.39 mmol, 1.00 eq) in 2 mL DCM wird Triethylamin (0.07 mL, 51 mg, 0.51 mmol, 1.30 eq) und Tritylchlorid (115 mg, 0.41 mmol, 1.05 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird langsam auf RT erwärmt und für 4 h gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit je 5 mL DCM und H<sub>2</sub>O versetzt. Die wässrige Phase

wird dreimal mit je 10 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 10:1) gereinigt.

**Ausbeute:** 210 mg (73%) von **54** als farbloser Feststoff.

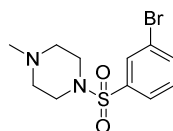
**HPLC:**  $t_R = 10.02$  min (92%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 7.46 (m, 1H), 7.68 (dd,  $J = 3.1$  Hz,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.91 (dd,  $J = 5.2$  Hz,  $J = 9.0$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 83.0, 116.4 (d,  $J_{C-F} = 3$  Hz), 118.6 (d,  $J_{C-F} = 24$  Hz), 119.5 (d,  $J_{C-F} = 24$  Hz), 126.6, 127.5, 127.8, 128.0 (6C), 128.5 (3C), 129.7 (6C), 135.8 (d,  $J_{C-F} = 9$  Hz), 140.7, 161.1 (d,  $J_{C-F} = 245$  Hz), 161.5.

#### 5.4.13 Synthese von BSc5184 (**61**)

**1-((3-Bromphenyl)sulfonyl)-4-methylpiperazin (**68**).**



**C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 319.22 g/mol.**

In einem ausgeheiztem mikrowellengeeigneten Gefäß wird 3-Brombenzolsulfonsäurechlorid (300 mg, 1.17 mmol, 1.00 eq) eingewogen und 5 min mit Argon gespült. Der Feststoff wird durch Zugabe von 6 mL THF (getrocknet) gelöst und die erhaltene klare Lösung auf 0°C abgekühlt. Unter Argonatmosphäre wird 1-Methylpiperazin (235 mg, 2.35 mmol, 2.00 eq) zugetropft, wobei ein farbloser Niederschlag ausfällt. Der Reaktionsansatz wird langsam auf RT erwärmt und für 2.5 h gerührt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt und der Rückstand in 10 mL EtOAc und 10 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die wässrige Phase wird dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das LM unter Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 385 mg (94%) von **68** als beiger Feststoff.

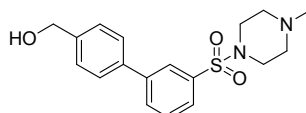
**HPLC:**  $t_R = 1.81$  min (98%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 2.13 (s, 3H), 2.35 (t,  $J = 5.1$  Hz, 4H), 2.93 (t,  $J = 5.1$  Hz, 4H), 7.62 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.75 (ddd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.6$ ,

$J = 1.0$  Hz, 1H), 7.85 (t,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 7.95 (ddd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.9$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 45.2, 46.7 (2C), 53.4 (2C), 122.4, 126.6, 129.6, 131.7, 136.1, 137.2.

**(3'-((4-Methylpiperazin-1-yl)sulfonyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methanol (69).**



$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ : 346.45 g/mol.

Nach AAV I wird 1-((3-Bromphenyl)sulfonyl)-4-methylpiperazin (**68**) (227 mg, 0.71 mmol, 1.00 eq) mit 4-(Hydroxymethyl)phenylboronsäure (216 mg, 1.42 mmol, 2.00 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (23 mg, 0.02 mmol, 0.03 eq) und 3.75 mL 2 N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung in 7.0 mL Toluol/EtOH (1:1) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Silica, DCM/MeOH 20:1) gereinigt.

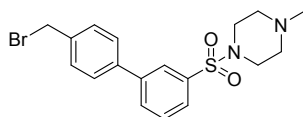
**Ausbeute:** 215 mg (87%) von **69** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 1.91$  min (88%).

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.13 (s, 3H), 2.36 (t,  $J = 4.79$  Hz, 4H), 2.94 (t,  $J = 4.79$  Hz, 4H), 4.57 (d,  $J = 5.61$  Hz, 2H), 5.24 (t,  $J = 5.61$  Hz, 1H), 7.46 (d,  $J = 8.45$  Hz, 2H), 7.72 (m, 4H), 7.88 (t,  $J = 1.73$  Hz, 1H), 8.02 (dt,  $J = 7.45$  Hz,  $J = 1.73$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 45.2, 45.7 (2C), 53.4 (2C), 62.5, 125.0, 126.2, 126.7 (2C), 127.1 (2C), 130.1, 131.3, 135.6, 136.7, 141.2, 142.8.

**1-((4'-(Brommethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)sulfonyl)-4-methylpiperazin (70).**



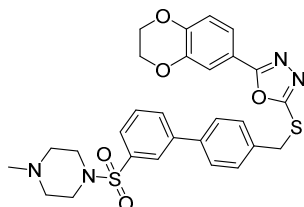
$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_2\text{S}$ : 409.34 g/mol.

Nach AAV III wird (3'-((4-Methylpiperazin-1-yl)sulfonyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methanol (**69**) (100 mg, 0.29 mmol, 2.50 eq) mit Phosphortribromid (31 mg, 0.12 mmol, 1.00 eq) in 3 mL Toluol umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

**Ausbeute:** 40 mg (33%) von **70** (Rohprodukt) als beiger Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 5.27$  min (98%).

**2-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-(((3'-((4-methylpiperazin-1-yl)sulfonyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)-1,3,4-oxadiazol (BSc5184 (61)).**



**C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>: 564.68 g/mol.**

In Anlehnung an AAV IV wird zu einer Lösung des entsprechenden 5-(2,3-Dihydrobenz[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol<sup>[289]</sup> (**39**) (20 mg, 0.08 mmol, 1.00 eq) in 1.6 mL DMF Kaliumcarbonat (14 mg, 0.10 mmol, 1.20 eq) zugegeben und die Lösung bei RT für 15 min gerührt. Anschließend wird 1-((4'-(Brommethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)sulfonyl)-4-methylpiperazin (**70**) (40 mg, 0.10 mmol, 1.20 eq) zugegeben. Der Reaktionsansatz wird auf 80°C erhitzt und für 24 h gerührt.

Anschließend wird der Reaktionsansatz auf RT abgekühlt und mit H<sub>2</sub>O versetzt. Das Rohprodukt wird als farbloser Niederschlag abfiltriert und mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silica, DCM/MeOH 40:1).

**Ausbeute:** 5 mg (11%) von **BSc5184 (61)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 6.11$  min (99%).

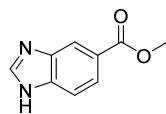
**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 2.41 (s, 3H), 2.68 (s, 4H), 3.22 (s, 4H), 4.30 (dd,  $J = 10.7$  Hz,  $J = 4.6$  Hz, 4H), 4.54 (s, 2H), 6.94 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.48 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.58 (m, 5H), 7.72 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.78 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.91 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 29.9, 36.6 (2C), 45.3, 54.0 (2C), 64.4, 64.8, 116.1, 117.0, 118.2, 120.6, 126.3, 126.6, 127.8 (2C), 129.9, 130.0 (2C), 131.8, 136.3, 139.2, 142.1, 144.0, 146.9, 163.1, 165.9.

**ESI-MS:**  $m/z$  (%): 564 (100, [M<sup>+</sup>]).

#### 5.4.14 Synthese von BSc5136 (73)

##### Methyl 1*H*-benz[*d*]imidazole-5-carboxylat (75).



**C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 176.18 g/mol.**

In einem ausgeheizten Mikrowellengefäß wird 1*H*-Benz[*d*]imidazol-5-carbonsäure (74) (300 mg, 1.85 mmol, 1.00 eq) unter Argon in 12 mL trockenem MeOH gelöst. Der Reaktionsansatz wird auf 0°C abgekühlt und Thionylchlorid (341 mg, 2.87 mmol, 1.55 eq) langsam zugetropft. Der Reaktionsansatz wird auf 50°C erhitzt und für 24 h gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und langsam auf 7 mL H<sub>2</sub>O gegeben. Das enthaltene MeOH wird unter Vakuum entfernt. Durch Zugabe von NaHCO<sub>3</sub>-Lösung wird der pH-Wert des wässrigen Rückstandes auf 6 eingestellt. Im Anschluss wird die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM im Vakuum entfernt.

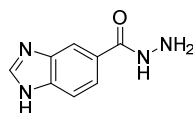
**Ausbeute:** 310 mg (95%) von **75** als brauner Feststoff.

**HPLC:** *t<sub>R</sub>* = 0.83 min (83%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):** δ (ppm) = 3.87 (s, 3H), 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.84 (dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.40 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):** δ (ppm) = 51.9, 112.1, 123.0, 123.3, 125.7, 137.9, 142.1, 144.6, 166.8.

##### 1*H*-Benz[*d*]imidazol-5-carbohydrazid (76).



**C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O: 176.18 g/mol.**

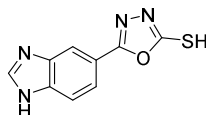
Zu einer Lösung aus Methyl-1*H*-benz[*d*]imidazole-5-carboxylat (**75**) (310 mg, 1.76 mmol, 1.00 eq) in 10 mL EtOH wird Hydrazin-Monohydrat (881 mg, 17.60 mmol, 10.00 eq) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 75°C unter Rückflusskühlung für 3 d gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf RT

abgekühlt und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktionsstufe weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** 260 mg (84%) von **76** (Rohprodukt) als brauner Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 0.70$  min (91%).

**5-(1*H*-Benz[*d*]imidazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**77**).**



**C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>OS: 218.23 g/mol.**

Das Rohprodukt 1*H*-Benz[*d*]imidazol-5-carbohydrazid (**76**) (260 mg, 1.48 mmol, 1.00 eq) wird in 10 mL EtOH gelöst. Kohlenstoffdisulfid (247 mg, 3.25 mmol, 2.20 eq) und Triethylamin (164 mg, 1.62 mmol, 1.10 eq) werden zugetropft. Der Reaktionsansatz wird auf 75°C erhitzt und unter Rückflusskühlung für 16 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 10 mL H<sub>2</sub>O und 10 mL EtOAc versetzt. Anschließend wird die organische Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 0.1 N Salzsäure gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter Vakuum eingeengt. Der erhaltene Rückstand wird aus Cyclohexan/EtOAc umkristallisiert.

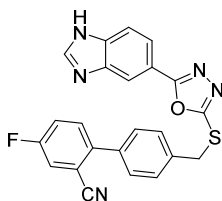
**Ausbeute:** 35 mg (11%) von **77** als roter Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 0.92$  min (90%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 7.75 (dd,  $J = 1.6$  Hz,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.79 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.10 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 8.50 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 113.9, 116.2, 120.1, 123.2, 137.9, 140.0, 144.5, 163.3, 177.3.

**4'-(((5-(1*H*-Benz[*d*]imidazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio)methyl)-4-fluor-[1,1'-biphenyl]-2-carbonitril (BSc5136 (73)).**



**C<sub>23</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>5</sub>OS: 427.46 g/mol.**

Nach AAV IV wird 5-(1*H*-Benz[*d*]imidazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**77**) (20 mg, 0.09 mmol, 1.00 eq) mit 4'-(Brommethyl)-4-fluor-[1,1'-biphenyl]-2-carbonitril<sup>[289]</sup> (**43a**) (40 mg, 0.14 mmol, 1.50 eq) und 0.2 mL 4 N NaOH-Lösung in 2 mL DMF umgesetzt. Nach der Extraktion des Rohproduktes aus der Reaktionslösung wird dieses mittels automatisierter Flash Chromatographie (*reversed phase* C18, MeCN/H<sub>2</sub>O, Gradient 0% bis 100% MeCN) gereinigt.

**Ausbeute:** 5 mg (13%) von **BSc5136 (73)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 5.53 min (95%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 4.68 (s, 2H), 7.57 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.66 (m, 4H), 7.77 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.83 (dd,  $J$  = 8.4 Hz,  $J$  = 1.4 Hz, 1H), 7.95 (m, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.42 (s, 1H).

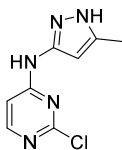
**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 35.5, 111.6 (d,  $J_{C-F}$  = 10 Hz), 116.6, 117.4 (d,  $J_{C-F}$  = 27 Hz), 120.3 (d,  $J_{C-F}$  = 7 Hz), 120.5, 121.0 (d,  $J_{C-F}$  = 21 Hz), 122.6 (d,  $J_{C-F}$  = 23 Hz), 125.5, 129.0 (2C), 129.4 (2C), 132.4 (d,  $J_{C-F}$  = 8 Hz), 136.2, 137.5, 139.6, 140.8 (d,  $J_{C-F}$  = 3 Hz), 144.3, 144.5, 160.8 (d,  $J_{C-F}$  = 246 Hz), 162.6, 166.2.

**EI-MS:**  $m/z$  (%): 427 (20, [M<sup>+</sup>]), 428 (5, [M<sup>+</sup> + H]).



#### 5.4.15 Synthese von BSc5224 (93a)

##### 2-Chlor-*N*-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (98a).



**C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>5</sub>:** 209.64 g/mol.

Nach AAV V wird 2,4-Dichlorpyrimidin (**98**) (250 mg, 1.68 mmol, 1.00 eq) mit 3-Amino-5-methyl-1H-pyrazol (**99a**) (163 mg, 1.68 mmol, 1.00 eq) und DIPEA (333 mg, 2.58 mmol, 1.54 eq) in 3 mL DMSO umgesetzt.

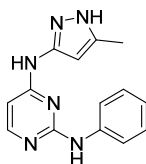
**Ausbeute:** 253 mg (72%) von **97a** als beiger Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 1.30$  min (88%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.24 (s, 1H), 8.16 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 10.26 (s, 1H), 12.14 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 10.6, 95.5, 104.9, 138.9, 147.3, 159.3 (2C), 160.8.

##### *N*<sup>4</sup>-(5-Methyl-1H-pyrazol-3-yl)-*N*<sup>2</sup>-phenylpyrimidin-2,4-diamin (BSc5224 (93a)).



**C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>:** 266.31 g/mol.

Nach AAV VI wird 2-Chlor-*N*-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (**97a**) (150 mg, 0.72 mmol, 1.00 eq) mit Anilin (**96**) (67 mg, 0.72 mmol) und 0.02 mL konzentrierter Salzsäure in 4.00 mL *n*-BuOH umgesetzt. Das ausgefallene Rohprodukt wird abfiltriert und anschließend mittels automatisierter Flash Chromatographie (*reversed phase C18*, H<sub>2</sub>O/MeCN, Gradient 0% bis 100% MeCN) gereinigt.

**Ausbeute:** 115 mg (60%) von **BSc5224 (93a)** als farbloser Feststoff.

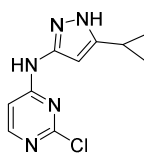
**HPLC:**  $t_R = 1.68$  min (99%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 1.41 (s, 3H), 5.42 (s, NH), 5.59 (s, NH), 6.48 (s, 1H), 6.71 (m, 6H), 6.90 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 9.98, 97.3, 99.2, 123.7 (2C), 126.1, 128.8 (4C), 135.4, 140.4, 141.0, 159.9.

#### 5.4.16 Synthese von BSc5231 (93b)

##### 2-Chlor-*N*-(5-cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (97b).



**C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>: 235.68 g/mol.**

Nach AAV V wird 2,4-Dichlorpyrimidin (**98**) (1210 mg, 8.12 mmol, 1.00 eq) mit 3-Amino-5-cyclopropyl-1*H*-pyrazol (**99b**) (1000 mg, 8.12 mmol, 1.00 eq) und DIPEA (1616 mg, 12.51 mmol, 1.54 eq) in 10 mL DMSO umgesetzt.

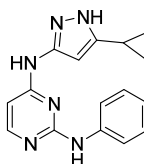
**Ausbeute:** 1759 mg (92%) von **97b** als beiger Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 1.99$  min (94%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 0.66 (m, 2H), 0.86 (m, 2H), 1.88 (m, 1H), 8.15 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 10.23 (s, 1H), 12.16 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 6.7, 7.7 (2C), 92.6, 104.9, 145.9, 147.2, 159.3, 160.8, 160.9.

##### *N*<sup>4</sup>-(5-Cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-*N*<sup>2</sup>-phenylpyrimidin-2,4-diamin (BSc5231 (93b)).



**C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>: 292.35 g/mol.**

Nach AAV VI wird 2-Chlor-*N*-(5-cyclopropyl-1*H*-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (**97b**) (200 mg, 0.849 mmol, 1.00 eq) mit Anilin (**96**) (79 mg, 0.849 mmol, 1.00 eq) und 0.04 mL konzentrierter Salzsäure in 3.20 mL *n*-BuOH umgesetzt. Das ausgefallene Rohprodukt wird abfiltriert und anschließend dreimal mit je 5 mL Cyclohexan und einmal mit sehr wenig DCM gewaschen.

**Ausbeute:** 159 mg (64%) von **BSc5231 (93b)** als beiger Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 2.65$  min (97%).

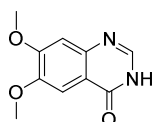
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 0.55 (s, 2H), 0.92 (m, 2H), 1.83 (s, 1H), 6.04 (s, 1N-H), 6.46 (s, 1N-H), 7.27 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 7.44 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.52 (s, 2H), 7.96 (s, 1H), 10.68 (s, 1H), 11.20 (s, 1N-H), 12.48 (s, 1N-H).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K): δ (ppm) = 6.7, 7.9 (2C), 93.3, 99.2, 132.4, 123.4, 125.5, 129.0 (2C), 136.5, 145.74, 146.5, 152.7, 157.4, 159.7.

ESI-MS: *m/z* (%): 293 (M<sup>+</sup>).

#### 5.4.17 Synthese von BSc5225 (94)

##### 6,7-Dimethoxyquinazolin-4(3*H*)-on (101).



C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 206.20 g/mol.

2-Amino-4,5-dimethoxybenzoesäure (103) (1705 mg, 8.65 mmol, 1.00 eq) wird in einem Überschuss an Formamid (102) (2.35 mL, 2649 mg, 58.83 mmol, 6.80 eq) gelöst. Die Reaktionslösung wird bei 160°C unter Rückflusskühlung für 16 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf RT abgekühlt, mit 2 mL H<sub>2</sub>O versetzt und für weitere 30 min bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und zweimal mit je 2 mL Diethylether gewaschen. Das zuvor erhaltene wässrige Filtrat wird dreimal mit je 10 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird aus Ethanol umkristallisiert.

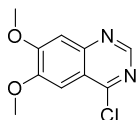
**Ausbeute:** 687 mg (39%) von 101 als farbloser Feststoff.

**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 1.13 min (96%).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) = 3.87 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 7.12 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 12.02 (s, 1H).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K): δ (ppm) = 55.7, 55.9, 104.9, 108.0, 115.6, 143.8, 144.8, 148.5, 154.4, 160.0.

##### 4-Chlor-6,7-dimethoxyquinazolin (100).



C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 224.64 g/mol.

In einem ausgeheizten mikrowelleneigneten Gefäß wird 6,7-Dimethoxyquinazolin-4(3*H*)-on (101) (200 mg, 0.97 mmol, 1.00 eq) in 14 Tropfen DMF (getrocknet)

aufgeschlämmt und in einem Überschuss Thionylchlorid (5.63 mL, 77.64 mmol, 80.00 eq) vollständig gelöst. Der Reaktionsansatz wird bei 75°C unter Rückflusskühlung für 16 h gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt, mit 3 mL Diethylether versetzt und für 30 min bei RT gerührt. Um das Produkt zu fällen, wird die Suspension im Kühlschrank bei 7°C für 2 h gekühlt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und zweimal mit je 2 mL Diethylether gewaschen.

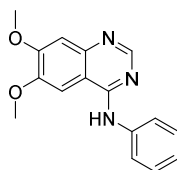
**Ausbeute:** 209 mg (96%) von **100** als beiger Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 4.40$  min (96%).

**$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 3.99 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 7.37 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 8.87 (s, 1H).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 56.1, 56.5, 102.2, 106.8, 118.6, 148.6, 151.4, 152.1, 156.7, 157.8.

#### **6,7-Dimethoxy-*N*-phenylquinazolin-4-amin (BSc5225 (94)).**



**$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ : 281.32 g/mol.**

Zu einer Lösung aus 4-Chlor-6,7-dimethoxyquinazolin (**100**) (50 mg, 0.22 mmol, 1.00 eq) in 2 mL *i*-Propanol (getrocknet) wird Anilin (**96**) (32 mg, 0.34 mmol, 1.55 eq) zugetropft. Der Reaktionsansatz wird bei 85°C für 16 h gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt, wobei ein Niederschlag ausfällt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und zweimal mit je 1 mL EtOAc gewaschen.

**Ausbeute:** 62 mg (98%) von **BSc5225 (94)** als beiger Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 3.02$  min (96%).

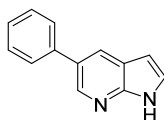
**$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 3.98 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 7.32 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.48 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 7.70 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 8.38 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 11.49 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K): δ (ppm) = 39.0, 39.2, 39.4, 39.5, 39.7, 39.9, 40.0, 56.4, 57.0, 99.7, 104.1, 107.2, 124.9, 126.3, 128.7, 135.4, 136.9, 148.5, 150.2, 156.2, 158.1.

EI-MS: *m/z* (%): 281 (100, [M<sup>+</sup>]).

#### 5.4.18 Synthese von BSc5226 (95)

##### 5-Phenyl-1*H*-pyrrol[2,3-*b*]pyridin (111).



C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N: 193.25 g/mol.

In einem mikrowelleneigneten Gefäß werden 5-Brom-7-azaindol (**112**) (1000 mg, 5.08 mmol, 1.00 eq) und Phenylboronsäure (**109**) (743 mg, 6.09 mmol, 1.20 eq) unter Argon in 15 mL Dioxan/H<sub>2</sub>O (2.5:1) gelöst. PdCl<sub>2</sub>(dppf)•DCM (207 mg, 0.25 mmol, 0.05 eq) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2104 mg, 15.23 mmol, 3.00 eq) werden hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 80°C unter Rückflusskühlung für 2 d gerührt und anschließend auf RT gebracht. Das Reaktionsgemisch wird mit 10 mL H<sub>2</sub>O versetzt und die wässrige Phase dreimal mit je 10 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM unter Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird aus Cyclohexan/EtOAc umkristallisiert.

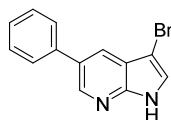
**Ausbeute:** 809 mg (82%) von **111** als beiger Feststoff.

**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 3.18 min (98%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) = 6.58 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.38 (ddd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.2 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.65 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 1.1 Hz, 2H), 8.16 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 10.37 (s, N-H).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, 300 K): δ (ppm) = 101.3, 120.5, 125.9, 127.2, 127.6 (2C), 129.1 (2C), 130.0, 139.8, 142.6 (2C), 148.3.

### 3-Brom-5-phenyl-1*H*-pyrrol[2,3-*b*]pyridin (110).



**C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrN: 272.15 g/mol.**

Zu einer Lösung aus 5-Phenyl-1*H*-pyrrol[2,3-*b*]pyridin (**111**) (696 mg, 3.58 mmol, 1.00 eq) in 15 mL Chloroform wird NBS (638 mg, 3.58 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei RT für 1 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 30 ml H<sub>2</sub>O versetzt und die wässrige Phase dreimal mit je 20 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 30 mL gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das LM im Vakuum entfernt.

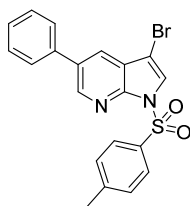
**Ausbeute:** 897 mg (92%) von **110** als brauner Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 7.95 min (98%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 7.39 (m, 1H), 7.49 (m, 2H), 7.75 (m, 3H), 8.01 (dd,  $J$  = 2.1 Hz,  $J$  = 0.5 Hz, 1H), 8.60 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 12.14 (s, 1N-H).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 87.4, 118.7, 124.1, 126.5, 127.0 (2C), 127.2, 129.0 (2C), 129.1, 138.4, 142.9, 146.7.

### 3-Brom-5-phenyl-1-tosyl-1*H*-pyrrol[2,3-*b*]pyridin (113).



**C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>BrNO<sub>2</sub>S: 426.33 g/mol.**

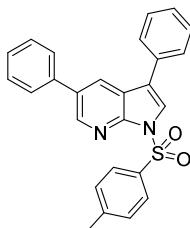
Zu einer Lösung aus 3-Brom-5-phenyl-1*H*-pyrrol[2,3-*b*]pyridin (**110**) (890 mg, 3.26 mmol, 1.00 eq), in 27 mL DCM wird *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (745 mg, 3.91 mmol, 1.20 eq) und 5 mL einer 4 N NaOH-Lösung hinzugegeben. Die klare Lösung wird auf 0°C abgekühlt und Tetrabutylammoniumchlorid (27 mg, 0.10 mmol, 0.03 eq) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird langsam auf RT erwärmt und für 16 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 30 mL H<sub>2</sub>O versetzt und die wässrige Phase dreimal mit je 20 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das LM im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 1376 mg (99%) von **113** als brauner Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 11.18$  min (96%).

**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 2.35 (s, 3H), 7.47 (m, 5H), 7.76 (m, 2H), 8.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.10 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.75 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H).

**3,5-Diphenyl-1-tosyl-1H-pyrrol[2,3-b]pyridin (**114**).**



**$\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{NO}_2\text{S}$ : 423.53 g/mol.**

Nach AAV I wird 3-Brom-5-phenyl-1-tosyl-1H-pyrrol [2,3-b]pyridin (**113**) (94 mg, 0.22 mmol, 1.00 eq) mit Phenylboronsäure (**109**) (32 mg, 0.26 mmol, 1.20 eq), Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (8 mg, 0.01 mmol, 0.03 eq) und 1.25 mL 2 N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung in 2.0 mL Toluol/EtOH (1:1) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels automatisierter Flash Chromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 8:1) gereinigt.

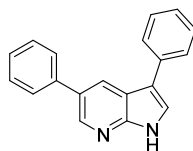
**Ausbeute:** 61 mg (65%) von **114** als brauner Feststoff.

**HPLC:**  $t_R = 11.41$  min (99%).

**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 2.35 (s, 3H), 7.41 (m, 4H), 7.50 (m, 4H), 7.76 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, 2H), 7.85 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, 2H), 8.08 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.24 (s, 1H), 8.41 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.72 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H).

**$^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 21.1, 119.7, 120.7, 124.0, 127.1 (2C), 127.4 (3C), 127.6 (2C), 127.8 (2C), 129.0 (2C), 129.1 (2C), 130.0 (2C), 131.9, 132.3, 134.5, 137.4, 143.8, 145.7, 146.4.

### 3,5-Diphenyl-1*H*-pyrrol[2,3-*b*]pyridin (BSc5226 (95).)



**C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>: 270.34 g/mol.**

In einer Mischung aus 15 mL MeOH und 0.2 mL 4 N NaOH-Lösung wird 3,5-Diphenyl-1-tosyl-1*H*-pyrrol[2,3-*b*]pyridin (**114**) (56 mg, 0.13 mmol, 1.00 eq) gelöst. Der Reaktionsansatz wird bei 50°C für 24 h gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und der pH-Wert durch Zugabe von 2 N Salzsäure auf 5-6 eingestellt. Das enthaltene MeOH wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in je 10 mL EtOAc und H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 10 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird per Säulenchromatographie (Silica, Cyclohexan/EtOAc 1:1) gereinigt.

**Ausbeute:** 26 mg (73%) von **BSc5226 (95)** als farbloser Feststoff.

**HPLC:**  $t_R$  = 6.42 min (97%).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 7.27 (m, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.48 (m, 4H), 7.78 (ddd,  $J$  = 12.7 Hz,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 1.1 Hz, 4H), 7.91 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 8.43 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 8.57 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 11.99 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz, 300 K):**  $\delta$  (ppm) = 114.7, 117.3, 124.6, 125.4, 125.7, 126.4 (2C), 126.9, 127.1 (2C), 128.8, 128.9 (2C), 128.9 (2C), 134.9, 139.0, 141.9, 148.6.

**EI-MS:**  $m/z$  (%): 270 (100, [M<sup>+</sup>]).



## 5.5 Allgemeine Angaben zur Bestimmung der wässrigen Löslichkeit

### 5.5.1 Durchführung der *Shake-Flask-Methode*

Die Löslichkeit der Verbindungen wird in VE-Wasser mit 2 Vol% DMSO unter Gleichgewichtsbedingungen bestimmt. Dazu wird ein Überschuss der zu testenden Substanz in 1 mL der Lösung gegeben und für 24 h bei 25°C mit Hilfe eines Reagenzglasschüttlers (*Heidolph*) geschüttelt. Anschließend wird die Probe zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC (*Agilent 1100*, Säule: *Reversed phase, Synergi 4u Hydro-RP 80A*, 4.6x150 mm; Diodenarray Detektor (*diode array detector*, DAD)  $\lambda = 280$  nm) analysiert. Für jede Substanz wird zuvor eine lineare Kalibriergerade (Peakfläche [mAu\*s] gegen Konzentration [ $\mu$ M]) erstellt. Ausgehend von den gemessenen Peakflächen der gesättigten Probe kann deren Konzentration mittels der Geradengleichung der Kalibriergeraden bestimmt werden.

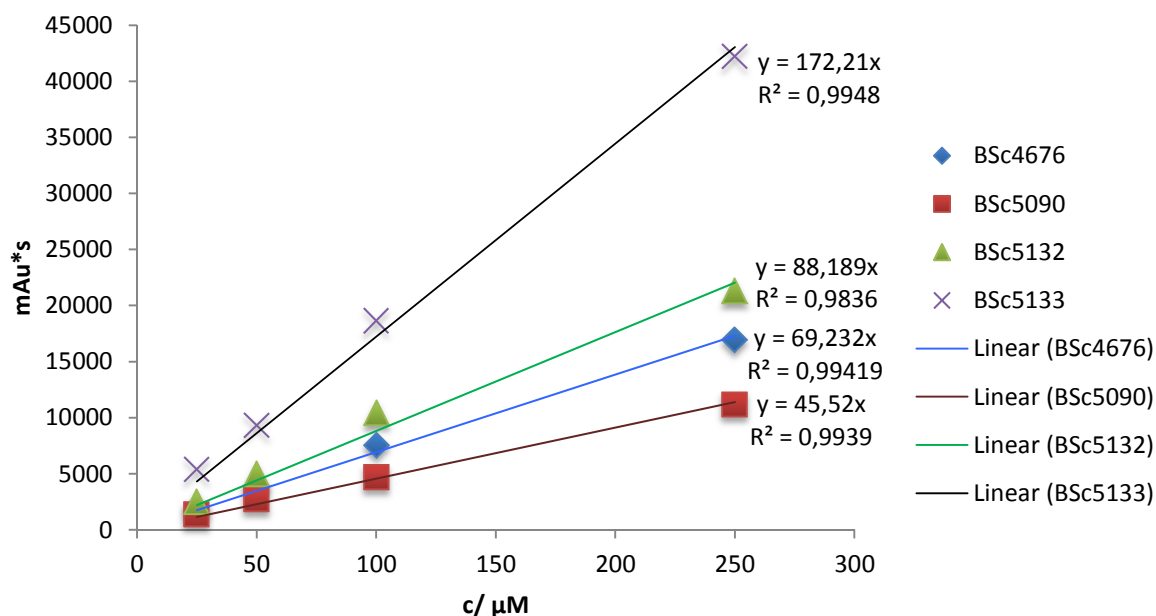
### 5.5.2 Erstellen der Kalibriergeraden

Für die Bestimmung der Löslichkeit wird anfangs von jeder zu testenden Substanz eine Kalibriergerade erstellt. Dazu werden jeweils 4 Kalibrierproben der Substanzen in MeCN mit einer Konzentration von 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 250  $\mu$ M mittels HPLC (*Agilent 1100*, Säule: *Reversed phase, Synergi 4u Hydro-RP 80A*, 4.6x150 mm; Diodenarray Detektor (*diode array detector*, DAD)  $\lambda = 280$  nm) gemessen und die gemessenen Peakflächen [mAu\*s] gegenüber den Konzentrationen [ $\mu$ M] aufgetragen.

### 5.5.3 Kalibriergeraden ausgewählter Substanzen zur Bestimmung der wässrigen Löslichkeit

In Abbildung 61 sind die Kalibriergeraden der Oxadiazol-Derivate BSc4676 (33), BSc5090 (36), BSc5132 (34d), BSc5133 (34c), BSc5185 (34e), BSc5186 (34h), BSc5215 (34f), BSc5216 (34g) und BSc5218 (35c) dargestellt.

**A**



**B**

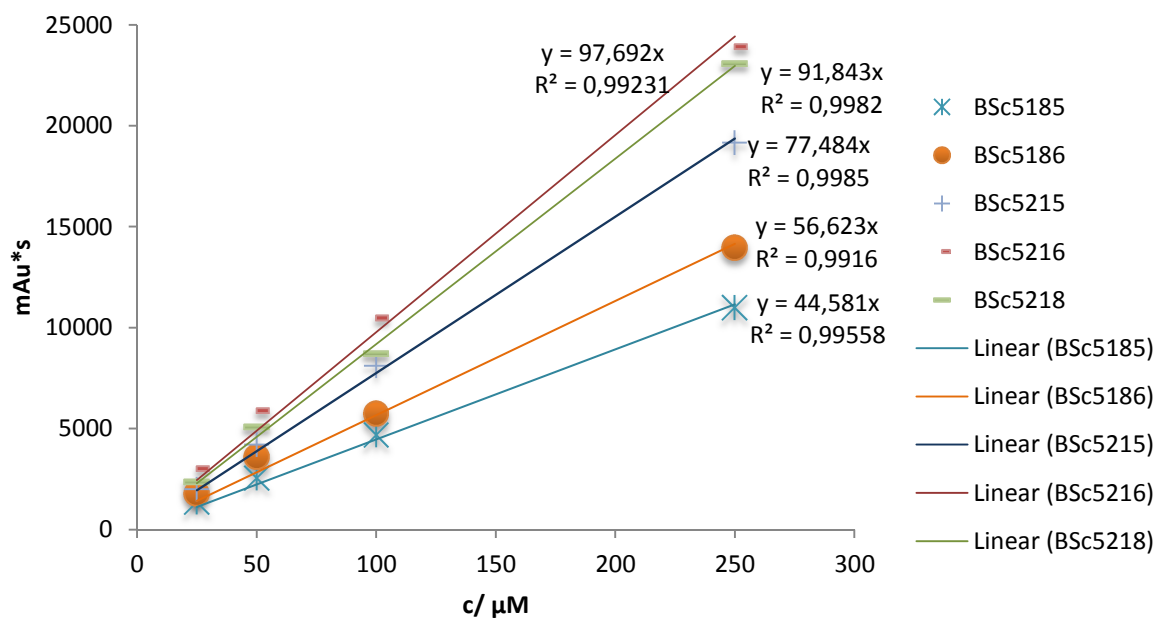


Abbildung 61: Kalibriergeraden mit Geradengleichungen. (A) BSc4676 (33), BSc5090 (36), BSc5132 (34d) und BSc5133 (34c). (B) BSc5185 (34e), BSc5186 (34h), BSc5215 (34f), BSc5216 (34g) und BSc5218 (35c).

## 5.6 Allgemeine Angaben zu der *in vitro* Evaluation

### 5.6.1 *In vitro* Assay zur Bestimmung der GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Inhibition

Die Messung der Aktivität der zu testenden Substanzen gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  erfolgte durch das französische Dienstleistungsunternehmen *Cerep* nach einer von *Greengard et al.* publizierten Prozedur.<sup>[229, 351-352]</sup>

Tabelle 31: *In vitro* Assay Bedingungen zur Bestimmung der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  Inhibition.

Assay	GSK-3 $\alpha$ ( <i>h</i> ) (ref. 2842) <sup>[351]</sup>	GSK-3 $\beta$ ( <i>h</i> ) (ref. 2879) <sup>[352]</sup>
Quelle	human rekombinant	human rekombinant
Substrat	ATP + ULight-CFFKNIVTPRTPPP SQGK-Amid (100 nM)	ATP + ULight-CFFKNIVTPRTPPP SQGK-Amid (100 nM)
Inkubation	60 min, RT	90 min, RT
Gemessener Abschnitt	Phospho-ULight-CFFKNIVTPRTPPP SQGK-Amid	Phospho-ULight-CFFKNIVTPRTPPP SQGK-Amid
Detektionsmethode	LANCE <sup>®</sup> Ultra	LANCE <sup>®</sup> Ultra
Referenzverbindung	Staurosporin IC <sub>50</sub> = 28 nM	Staurosporin IC <sub>50</sub> = 50 nM

Die GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Aktivität wird fluorimetrisch mit der LANCE<sup>®</sup> Ultra Methode (*lanthanide chelate excite*, LANCE) der Firma *PerkinElmer* bestimmt.<sup>[353]</sup> Diese Methode basiert auf dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET). Das FRET-Paar besteht aus einem Europium-Chelat-Fluorophor als Donor und dem ULight-Fluorophor der Firma *PerkinElmer* als Akzeptor. Dabei wird zunächst ein ULight-markiertes spezifisches Substrat von der zu testenden Kinase phosphoryliert. In einer anschließenden Reaktion binden Europium-markierte-anti-phospho-Antikörper an die phosphorylierten ULight-markierten Substrate und bringen so das FRET-Paar in räumliche Nähe. Wird der Europium-Fluorophor bei einer Wellenlänge von 320/340 nm angeregt, so erfolgt ein FRET auf den ULight-Fluorophor, welcher dadurch Licht der Wellenlänge 665 nm emittiert. Die Intensität der Lichtemission ist dabei proportional zur Phosphorylierung des spezifischen Substrates.<sup>[353]</sup>

## Assay Durchführung

GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  werden aus dem Gehirn von Schweinen isoliert und mit Hilfe einer Affinitäts-Chromatographie auf immobilisiertem Axin gereinigt. GSK-3 $\alpha/\beta$  werden in einer 1/1000 Verdünnung in der folgenden Stammlösung für 60 min/90 min bei RT inkubiert.<sup>[229]</sup>

Stammlösung [30  $\mu$ L]:

- 1 mg BSA/ml 10 mM DTT-Lösung
- 5  $\mu$ l von 40  $\mu$ M GS-1 Peptid
- 100 nM spezifisches GSK-3 $\alpha/\beta$  Substrat (ULight-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-Amid)
- Puffer A (10 mM Tris-Cl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% Triton X-100)
- 15  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/mmol; 1 mCi/mL)

Die Inhibition von GSK-3 $\alpha/\beta$  wird aus der Messung der Phosphorylierung des spezifischen Substrats zum Produkt Phospho-ULight-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-Amid in Anwesenheit eines potentiellen Inhibitors, im Vergleich zum Umsatz einer Negativkontrolle (Wasser, DMSO) ermittelt. Als Positivkontrolle wird Staurosporin eingesetzt. Jede Bestimmung wird in Duplikaten gemessen.

## Analyse und Darstellung der Messergebnisse

Für die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte wird die %-Restaktivität in Duplikaten bei acht unterschiedlichen Konzentrationen gemessen.

$$\% - \text{Restaktivität} = \frac{\text{gemessene spezifische Aktivität in Anwesenheit des Inhibitors}}{\text{spezifische Kontrollaktivität in Anwesenheit von Staurosporin}} \cdot 100 \quad (\text{III})$$

Die Analyse und Auswertung der Messergebnisse erfolgt durch *Cerep*. Dabei werden die Mittelwerte der Duplikatmessungen gegen die logarithmische Konzentration aufgetragen und mittels der nicht-linearen Hill-Funktion (III) die Regressionskurve angepasst.

$$Y = D + \left[ \frac{(A-D)}{\left(1 + \left(\frac{C}{C_{50}}\right)^{nH}\right)} \right] \quad (\text{IV})$$

Mit Y = spezifische Aktivität, A = Linke Asymptote der Kurve, D = Rechte Asymptote der Kurve, C = Konzentration, C<sub>50</sub> = IC<sub>50</sub> und nH = Steigung.

Die Einzelwert-Bestimmungen werden mit einer Konzentration von 1  $\mu$ M der Testsubstanz jeweils als Duplikat durchgeführt. Die Messergebnisse der Einzelwert-Bestimmungen sind angegeben als %-Inhibition:

$$\% \text{-Inhibition} = 100 - \left( \frac{\text{gemessene spezifische Aktivität in Anwesenheit des Inhibitors}}{\text{spezifische Kontrollaktivität in Anwesenheit von Staurosporin}} \cdot 100 \right) \text{ (II)}$$

### Messergebnisse und Regressionskurven der IC<sub>50</sub>-Bestimmung

In Tabelle 32 sind die Messergebnisse der %-Restaktivität von GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  durch die Leitstruktur **BSc4676 (33)** zusammengefasst.

Tabelle 32: Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von **BSc4676 (33)** gegenüber GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ .

Konzentration von BSc4676 (33) [M]	GSK-3 $\alpha$ %-Restaktivität			GSK-3 $\beta$ %- Restaktivität		
	1. Punkt	2. Punkt	Mittelwert	1. Punkt	2. Punkt	Mittelwert
3.0E-11	108.3	101.8	105.1	99.0	99.4	99.2
3.0E-10	109.4	106.4	107.9	102.4	104.6	103.5
1.0E-09	107.5	103.4	105.4	115.6	113.2	114.4
3.0E-09	106.8	97.3	102.0	113.5	111.2	112.4
1.0E-08	105.8	105.1	105.5	110.6	107.7	109.1
3.0E-08	101.6	106.7	104.1	104.2	104.2	104.2
1.0E-07	91.7	91.9	91.8	94.4	92.6	93.5
1.0E-06	4.7	12.4	8.5	69.1	73.5	71.3

Die Auftragung der gemittelten Messergebnisse der %-Restaktivität von GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  durch **BSc4676 (33)** ist in Abbildung 62 dargestellt.

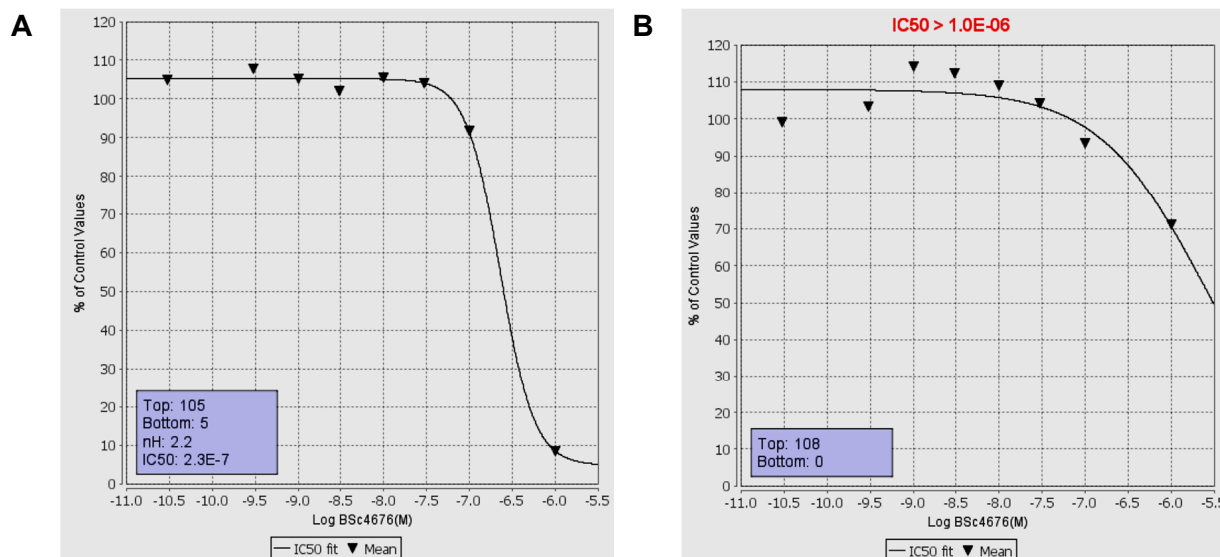


Abbildung 62: Auftragung der gemittelten GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  %-Restaktivität der gemessenen Duplikate gegenüber der logarithmischen Konzentration der getesteten Substanz sowie die aus der Hill-Funktion angepasste Regressionsgerade. (A) GSK-3 $\alpha$  in Anwesenheit von **BSc4676 (33)**. (B) GSK-3 $\beta$  in Anwesenheit von **BSc4676 (33)**.

Die Messergebnisse der %-Restaktivität der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  in Anwesenheit von **BSc5090 (36)** sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von **BSc5090 (36)** gegenüber GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ .

Konzentration von BSc5090 (36) [M]	GSK-3 $\alpha$ %-Restaktivität			GSK-3 $\beta$ %-Restaktivität		
	1. Punkt	2. Punkt	Mittelwert	1. Punkt	2. Punkt	Mittelwert
3.0E-11	100.3	100.3	100.3	107.3	100.8	104.0
3.0E-10	100.0	95.0	97.5	107.3	109.0	108.1
1.0E-09	94.6	95.5	95.0	109.4	107.6	108.5
3.0E-09	71.8	107.2	89.5	122.5	113.1	117.8
1.0E-08	68.4	85.2	76.8	102.3	107.8	105.1
3.0E-08	67.3	65.6	66.5	95.5	89.6	92.5
1.0E-07	5.3	20.7	13.0	80.8	48.5	64.7
1.0E-06	0.9	1.8	1.3	4.5	15.5	10.0

Die Auftragung der gemittelten Messergebnisse der %-Restaktivität von GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  durch **BSc5090 (36)** ist in Abbildung 63 dargestellt.

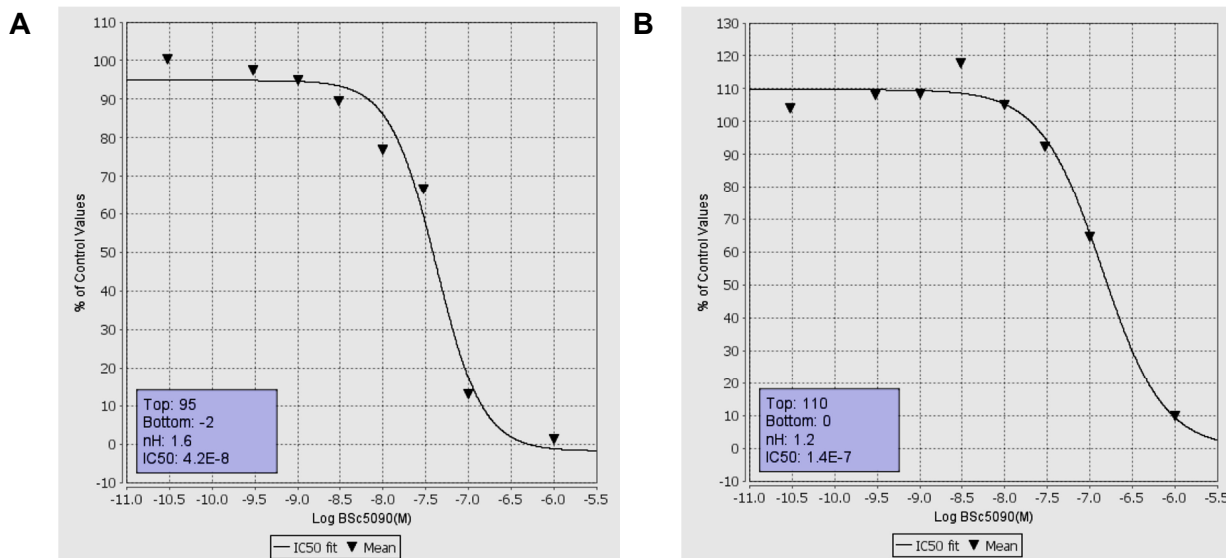


Abbildung 63: Auftragung der gemittelten GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  %-Restaktivität der gemessenen Duplikate gegenüber der logarithmischen Konzentration der getesteten Substanz sowie die aus der Hill-Funktion angepasste Regressionsgerade. (A) GSK-3 $\alpha$  in Anwesenheit von **BSc5090 (36)**. (B) GSK-3 $\beta$  in Anwesenheit von **BSc5090 (36)**.

Die Messergebnisse der %-Restaktivität der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  in Anwesenheit von **Tivantinib (115)** sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 34: Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von **Tivantinib (115)** gegenüber GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ .

Konzentration von Tivantinib (115) [M]	GSK-3 $\alpha$			GSK-3 $\beta$		
	% - Restaktivität			% - Restaktivität		
	1. Punkt	2. Punkt	Mittelwert	1. Punkt	2. Punkt	Mittelwert
3.0E-07	111.2	97.1	104.2	95.3	93.6	94.5
1.0E-06	80.8	91.9	86.3	95.3	93.4	94.4
3.0E-06	56.2	76.9	66.5	95.9	87.0	91.5
1.0E-05	40.1	37.7	38.9	83.9	84.4	84.1
1.5E-05	20.3	29.3	24.8	87.0	68.0	77.5
3.0E-05	21.3	8.8	15.0	48.3	36.7	42.5
7.0E-05	14.7	15.5	15.1	21.5	20.9	21.2
1.0E-04	13.7	27.3	20.5	20.3	24.1	22.2

Die Auftragung der gemittelten Messergebnisse der %-Restaktivität von GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  durch **Tivantinib (115)** ist in Abbildung 64 dargestellt.

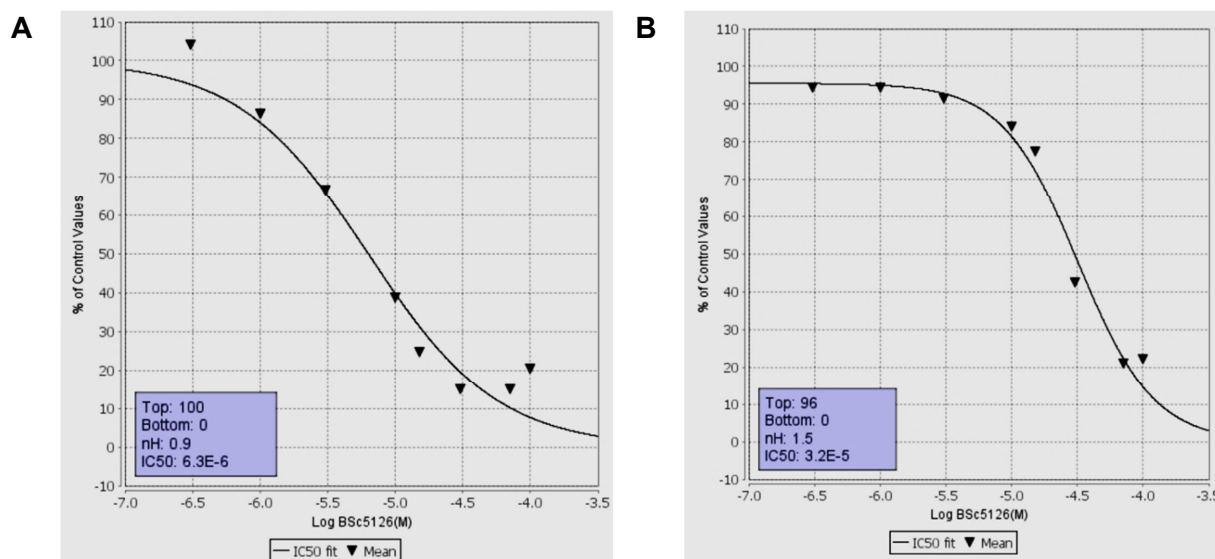


Abbildung 64: Auftragung der gemittelten GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  %-Restaktivität der gemessenen Duplikate gegenüber der logarithmischen Konzentration von **Tivantinib (115)** sowie die aus der Hill-Funktion angepasste Regressionsgerade. (A) GSK-3 $\alpha$  in Anwesenheit von **Tivantinib (115)**. (B) GSK-3 $\beta$  in Anwesenheit von **Tivantinib (115)**. (Anmerkung: **Tivantinib (115)** wurde innerhalb der Messung aufgrund der internen Datenbank zu **BSc5126** umbenannt.)

### 5.6.2 Z'-LYTE<sup>®</sup> Kinase Assay

Das Z'-LYTE<sup>®</sup> Kinase Assay wurde von dem Unternehmen *Life Technologies Ltd.*<sup>[354]</sup> für die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von **BSc5090 (36)** gegenüber der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  sowie für das Selektivitäts-Screening von **BSc5090 (36)** gegenüber 50 humanen Kinasen durchgeführt.<sup>[355]</sup>

Innerhalb des Z'-LYTE<sup>®</sup> Assays wird die jeweilige Kinase-Aktivität fluorimetrisch in einem kombinierten Enzym-Assay bestimmt. Dabei wird ein Peptid, welches durch zwei Fluorophore markiert ist von der zu testenden Kinase phosphoryliert. Die beiden Fluorophore befinden sich am N- sowie am C-Terminus des Peptides und bilden zusammen ein FRET-Paar. In einer nachfolgenden Reaktion werden nicht phosphorylierte FRET-Peptide durch das Hilfsenzym, eine spezifische Protease, gespalten. Die Spaltung zerstört den FRET zwischen dem Donor- und dem Akzeptor-Fluorophor, der somit nicht mehr gemessen werden kann.<sup>[355]</sup>

### Z'-LYTE<sup>®</sup> Assay Durchführung<sup>[355]</sup>

1. 100 nL von 100x Testsubstanz in 100% DMSO
2. 2.4  $\mu$ L von Kinasepuffer
3. 5  $\mu$ L von 2x Peptid/Kinase-Mix



4. 2.5  $\mu\text{L}$  von 4x ATP-Mix
5. 30 s Schütteln
6. 60 min Inkubation bei RT
7. 5  $\mu\text{L}$  Entwicklungsreagenz (enthält spezifische Protease)
8. 30 s Schütteln
9. 60 min Inkubation bei RT
10. Fluoreszenzmessung

Tabelle 35: Kinase-spezifische Assay-Bedingungen.<sup>[355]</sup>

Kinase	Z'-LYTE <sup>®</sup> Substrat	ATP Km app [ $\mu\text{M}$ ]	ATP Bin [ $\mu\text{M}$ ]	Kontrollinhibitor / IC <sub>50</sub> [nM]
GSK3A (GSK3 $\alpha$ )	Ser/Thr 09	9	10	Staurosporin / 143
GSK3B (GSK3 $\beta$ )	Ser/Thr 09	7	10	Staurosporin / 122
EGFR (ErbB1)	Tyr 04	11.5	10	Staurosporin / 68.2
LCK	Tyr 02	45	50	Tyrphostin AG1478 / 1180
PRKCB2 (PKC $\beta$ II)	Ser/Thr 07	225	200	Staurosporin / 1.03
FLT3	Tyr 02	470	500	Tyrphostin AG1478 / 2190
PAK2 (PAK65)	Ser/Thr 20	89	75	Staurosporin / 6.28
MAPK1 (ERK2)	Ser/Thr 03	100	100	Staurosporin / 1940
MAP4K4 (HGK)	Ser/Thr 07	12.7	10	Staurosporin / 1.09
PIM2	Ser/Thr 07	3	5	Staurosporin / 25.5
SGK (SGK1)	Ser/Thr 06	36	25	Staurosporin / 13.5
FGFR2	Tyr 04	1	5	Staurosporin / 2.84
SRC	Tyr 02	50	50	Tyrphostin AG1478 / 2610
FGFR3	Tyr 04	80	75	Staurosporin / 31.3
FGFR1	Tyr 04	20	25	Staurosporin / 6.89
CDK1/ cyclin A2	Ser/Thr 12	31	25	Staurosporin / 2.95
PRKACA (PKA)	Ser/Thr 01	4	5	Staurosporin / 1.84
MAPKAPK2	Ser/Thr 04	2.5	5	Staurosporin / 508

MAPK14 (p38 $\alpha$ ) Direct	Ser/Thr 04	Cascade	100	Staurosporin / 3020
EPHA2	Tyr 01	65.4	75	Staurosporin / 239
CHUK (IKK $\alpha$ )	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
AURKA (Aurora A)	Ser/Thr 01	10	10	Staurosporin / 3.61
MET (cMet)	Tyr 06	64	50	Staurosporin / 111
MARK1 (MARK)	Ser/Thr 21	7	5	Staurosporin / 24.2
AKT1 (PKB $\alpha$ )	Ser/Thr 06	75	75	Staurosporin / 18.7
CSNK1A1 (CK1 $\alpha$ 1)	Ser/Thr 11	2	5	TBB / 11600
EPHA3	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
NEK2	Ser/Thr 07	150	150	Staurosporin / 6140
JAK3	Tyr 06	14	10	Staurosporin / 0.88
ABL1	Tyr 02	12	10	Staurosporin / 415
RAF1 (cRAF) Y340D Y341D	Ser/Thr 03	Cascade	100	Staurosporin / 49.1
MAPK8 (JNK1)	Ser/Thr 04	Cascade	100	Staurosporin / 1540
SIK1	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
CHEK1 (CHK1)	Ser/Thr 19	53	50	Staurosporin / 1.34
EPHB4	Tyr 01	115	100	Tyrphostin AG1478 / 1400
MAP2K6 (MKK6)	Ser/Thr 03	Cascade	100	Staurosporin / 4.21
MKNK2 (MNK2)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
PAK4	Ser/Thr 20	3	5	Staurosporin / 5.08
IRAK4	Ser/Thr 07	34	25	Staurosporin / 247
MST4	Ser/Thr 07	28	25	Staurosporin / 5.19
CDK2/ cyclin A	Ser/Thr 12	31	25	Staurosporin / 2.95
KDR (VEGFR2)	Tyr 01	78	75	Staurosporin / 5.68
PDK1 Direct	Ser/Thr 07	27	25	Staurosporin / 5.51

NTRK1 (TRKA)	Tyr 01	425	400	Staurosporin / 3.54
PLK1	Ser/Thr 16	12.8	10	Staurosporin / 624
CHEK2 (CHK2)	Ser/Thr 07	84	75	Staurosporin / 17.2
ROCK1	Ser/Thr 07	3.1	5	Staurosporin / 3.27
TAOK2 (TAO1)	Ser/Thr 07	322	300	Staurosporin / 17.8
CAMK2A (CaMKII $\alpha$ )	Ser/Thr 04	10	10	Staurosporin / 0.75

### Analyse und Darstellung der Messergebnisse<sup>[355]</sup>

Das Verhältnis zwischen Emission des Donor- und der Emission des Akzeptor-Fluorophors nach Anregung des Donor-Fluorophors bei 400 nm ermöglicht eine Quantifizierung der Reaktion (Gleichung IV).

$$\text{Emissionsverhältnis (EV)} = \frac{\text{Donor Emission (445 nm)}}{\text{Akzeptor Emission (520 nm)}} \quad (\text{V})$$

Die gespaltenen und die nicht gespaltenen FRET-Peptide tragen zu dem Fluoreszenzsignal bei und somit auch zum Emissionsverhältnis (EV). Daher kann der Phosphorylierungsgrad und folglich die Enzymaktivität aus dem EV berechnet werden. Dafür enthält jedes Assay zwei Kontrollen, die Positivkontrolle (100% Phosphorylierung, 100% Phos) und die Negativkontrolle (0% Phosphorylierung, 0%-Phos). Bei der Positivkontrolle wird ein synthetisch präphosphoryliertes Peptid mit Substrat-analoger Aminosäuresequenz eingesetzt. Die Negativkontrolle enthält kein ATP und kann daher keine Kinaseaktivität aufweisen. Der prozentuale Anteil an phosphoryliertem Peptid (%-Phos) kann mit Gleichung (V) berechnet werden:

$$\% - \text{Phos} = \left\{ 1 - \frac{(EV \cdot A_{100\%}) - D_{100\%}}{(D_{0\%} - D_{100\%}) + [EV \cdot (A_{100\%} - A_{0\%})]} \right\} \cdot 100 \quad (\text{VI})$$

Mit folgenden Abkürzungen:

$A_{100\%}$  = durchschnittliche Akzeptor-Emission der 100% Phos Kontrolle

$A_{0\%}$  = durchschnittliche Akzeptor-Emission der 0% Phos Kontrolle

$D_{100\%}$  = durchschnittliche Donor-Emission der 100% Phos Kontrolle

$D_{0\%}$  = durchschnittliche Donor-Emission der 100% Phos Kontrolle

Für die Bestimmung der %-Inhibition gegenüber den Kinasen wird zusätzlich eine Kontrolle bei 0% Inhibition mit einer aktiven Kinase gemessen.

Daraus ergibt sich für die Berechnung der %-Inhibition folgende Gleichung (VI):

$$\% - Inhibition = \left\{ 1 - \frac{\% Phos_{Probe}}{\% Phos_{0\% Inhibition}} \right\} \cdot 100 \quad (VII)$$

Für die Qualitätskontrolle des Assays wird außerdem eine Messung mit einem Kontrollinhibitor, Staurosporin oder Tyrphostin AG1478, durchgeführt.

### Messergebnisse des Selektivitäts-Screenings von BSc5090 (36) gegenüber 50 Kinasen

In Tabelle 36 sind die Messergebnisse der %-Inhibition des Selektivitäts-Screenings von **BSc5090 (36)** gegenüber 50 Kinasen zusammengefasst.

Tabelle 36: Aktivität von 50 verschiedenen Kinasen in Anwesenheit von **BSc5090 (36)**.

Kinase	% - Inhibition		% - Inhibition
	1. Punkt	2. Punkt	Mittelwert
GSK3A (GSK3 alpha)	95	95	95
GSK3B (GSK3 beta)	95	95	95
EGFR (ErbB1)	11	15	13
LCK	11	14	12
PRKCB2 (PKC beta II)	11	11	11
FLT3	11	9	10
PAK2 (PAK65)	18	1	10
MAPK1 (ERK2)	10	9	9
MAP4K4 (HGK)	7	11	9
PIM2	7	11	9
SGK (SGK1)	6	11	9
FGFR2	9	7	8
SRC	7	7	7
FGFR3	12	1	6
FGFR1	7	4	6
CDK1/cyclin A2	16	-5	5
PRKACA (PKA)	3	6	5
MAPKAPK2	2	6	4
MAPK14 (p38 alpha) Direct	1	7	4
EPHA2	3	4	4
CHUK (IKK alpha)	11	-4	3
AURKA (Aurora A)	1	6	3

MET (cMet)	7	-1	3
MARK1 (MARK)	2	3	2
AKT1 (PKB alpha)	0	3	1
CSNK1A1 (CK1 alpha 1)	3	0	1
EPHA3	-2	4	1
NEK2	-2	3	1
JAK3	2	-3	0
ABL1	0	-1	-1
RAF1 (cRAF) Y340D Y341D	-1	-2	-1
MAPK8 (JNK1)	-2	-3	-3
SIK1	-2	-3	-3
CHEK1 (CHK1)	-2	-4	-3
EPHB4	-10	3	-4
MAP2K6 (MKK6)	1	-9	-4
MKNK2 (MNK2)	-7	-1	-4
PAK4	-3	-6	-4
IRAK4	-5	-6	-5
MST4	-5	-7	-6
CDK2/cyclin A	-9	-4	-6
KDR (VEGFR2)	-17	3	-7
PDK1 Direct	-6	-9	-7
NTRK1 (TRKA)	-14	-8	-11
PLK1	-13	-13	-13
CHEK2 (CHK2)	-8	-20	-14
ROCK1	-16	-13	-15
TAOK2 (TAO1)	-18	-12	-15
CAMK2A (CaMKII alpha)	-22	-11	-16

## Messergebnisse der IC<sub>50</sub>-Bestimmung mittels Z'LYTE<sup>®</sup> Assay

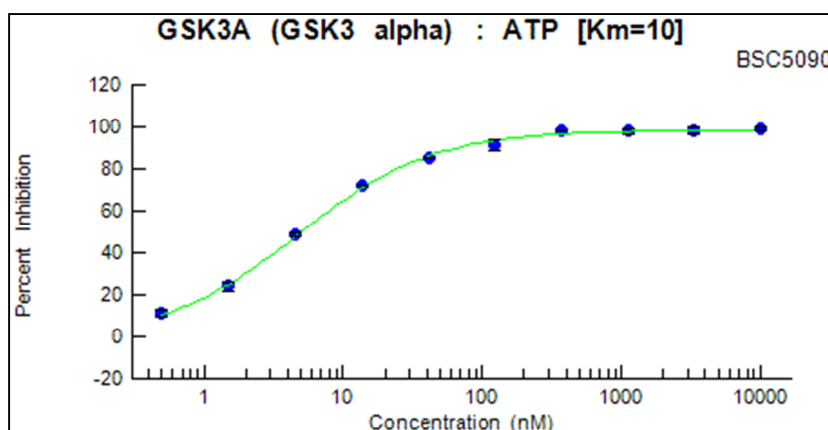
Für die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von **BSc5090 (36)** gegenüber GSK-3 $\alpha$ /- $\beta$  wurden die %-Inhibition in Duplikaten bei zehn unterschiedlichen Konzentrationen gemessen. Die Analyse und Auswertung der Messergebnisse erfolgte durch *Life Technologies Ltd.*<sup>[354]</sup> Die Messergebnisse der %-Inhibition der GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  in Anwesenheit von **BSc5090 (36)** sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

Tabelle 37: Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von **BSc5090 (36)** gegenüber GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  mittels Z'LYTE<sup>®</sup> Assay.

Konzentration von BSc5090 (36) [nM]	GSK-3 $\alpha$ %-Inhibition		GSK-3 $\beta$ %-Inhibition	
	1. Punkt	2. Punkt	1. Punkt	2. Punkt
10000	98	99	93	91
3330	99	96	91	92
1110	98	96	89	91
370	98	98	85	87
123	94	89	76	78
41.2	85	85	65	62
13.7	72	71	37	35
4.57	47	49	17	16
1.52	22	25	-2	5
0.495	12	9	-6	1

Die Auftragung der Messergebnisse gegen die Inhibitorkonzentration ist in Abbildung 65 dargestellt.

A



B

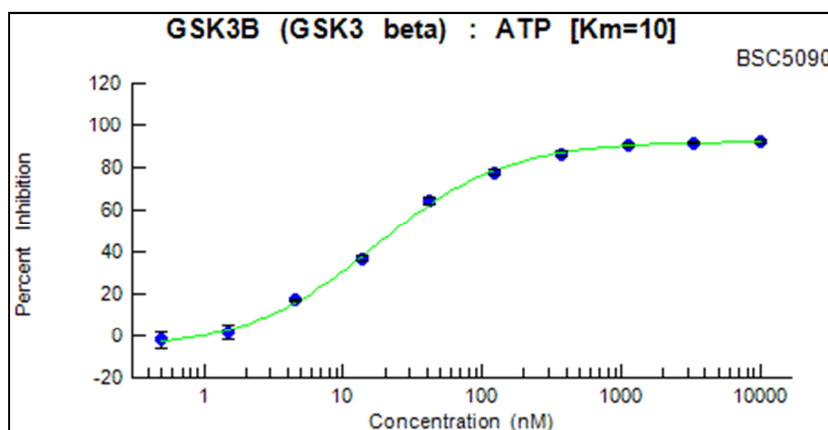


Abbildung 65: Auftragung der GSK-3 $\alpha/\beta$  %-Inhibition der im Z'LYTE<sup>®</sup> Assay gemessenen Duplikate gegenüber der logarithmischen Konzentration der getesteten Substanz sowie der angepasste sigmoidale Fit. (A) GSK-3 $\alpha$  in Anwesenheit von **BSc5090 (36)**. (B) GSK-3 $\beta$  in Anwesenheit von **BSc5090 (36)**.

### 5.6.3 *In vitro* Assay zur Bestimmung der *hQC*-Inhibition

Die Messung der inhibitorischen Aktivität von **BSc5136 (73)** gegenüber der *hQC* erfolgte in Kooperation mit *Demuth et al.* vom *Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI* in Halle nach einer von *Lee et al.*<sup>[356]</sup> publizierten Prozedur.<sup>[322]</sup>

Die *hQC* Aktivität wird fluorimetrisch in einem kombinierten Assay bestimmt. Dabei wird zuerst das Substrat Gln-AMC durch die *hQC* zu pGlu-AMC umgesetzt. Anschließend wird das entstandene pGlu-AMC durch das Hilfsenzym Pyroglutamyl-Peptidase hydrolysiert. Das abgespaltene AMC wird anschließend mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$  und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$  detektiert. Die fluorimetrischen Messungen werden mit drei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen jeweils als Duplikat durchgeführt.<sup>[322]</sup>

Gln-AMC, Pyroglutamyl-Peptidase und *hQC* werden in 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0) Puffer gelöst. Es wird eine 0.1 M Stammlösung des Inhibitors in Wasser mit DMSO als Lösungsvermittler angesetzt. Es ist darauf zu achten, dass die finalen Probe-Lösungen weniger als 1 Vol% DMSO enthalten, damit die *hQC* Aktivität nicht beeinflusst wird. Ausgehend von der 0.1 M Stammlösung wird eine Konzentrationsreihe des Inhibitors in 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0) Puffer erstellt. Die finalen Proben-Lösungen enthalten jeweils 100  $\mu\text{L}$  unterschiedlicher Substrat-Konzentrationen ( $0.25-4 \cdot K_m$ ), 100  $\mu\text{L}$  verschiedener Inhibitorkonzentrationen, 25  $\mu\text{L}$  der Pyroglutamyl-Peptidase (0.1 U/mL) und 25  $\mu\text{L}$  der *hQC* (0.12  $\mu\text{g/mL}$ ). Nach 10 min Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe der *hQC* gestartet. Anschließend wird über einen Zeitraum von 10 min die Fluoreszenz des entstandenen AMC bei 30°C gemessen. Alle Messungen werden mit dem *Mikroplate-Reader NOVOSTAR* der Firma *BMG* durchgeführt. Die Analyse und Auswertung der Messergebnisse erfolgt mithilfe der Software *GraFit* (*Erithacus Software Ltd.*).<sup>[322]</sup>

### Messergebnisse und Auswertung der Enzymkinetik

In Tabelle 38 sind die Messergebnisse der Enzymkinetik der *hQC* in Anwesenheit von **BSc5136 (73)** zusammengefasst.

Tabelle 38: Messergebnisse der Enzymkinetik der *hQC* gegenüber **BSc5136 (73)**.

Konzentration von Gln-AMC [mM]		relative Fluoreszenz pro min [RFU/min]		
		ohne BSc5136 (73)	0.0125 mM von BSc5136 (73)	bei 0.0250 mM von BSc5136 (73)
0.0313	1. Punkt	866.3761	221.5914	130.7563
	2. Punkt	860.0368	205.6723	102.6366
0.0625	1. Punkt	1261.4968	370.1208	206.5546
	2. Punkt	1250.5462	372.3319	223.0725
0.1250	1. Punkt	1686.7647	643.5767	395.0788
	2. Punkt	1677.1061	632.9622	401.5336
0.2500	1. Punkt	1770.5987	964.6324	616.5914
	2. Punkt	1673.0147	881.0557	635.9874



In Abbildung 66 ist die gemessene relative Fluoreszenz des entstandenen AMC pro min (RFU/min) gegenüber der Substratkonzentration (Gln-AMC) aufgetragen. Es zeigt sich die Kinetik einer kompetitiven Hemmung.

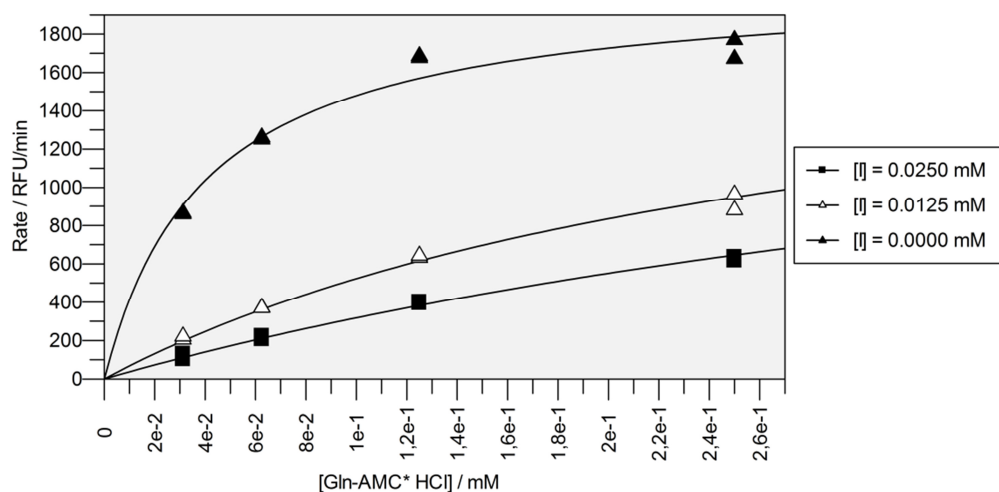


Abbildung 66: Kinetik des kompetitiven Inhibitors **BSc5136 (73)** bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen [I].

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter und der Inhibitionskonstante werden die Messergebnisse in einem Eadie-Hofstee-Diagramm und einem doppelreziproken Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen (Abbildung 67).

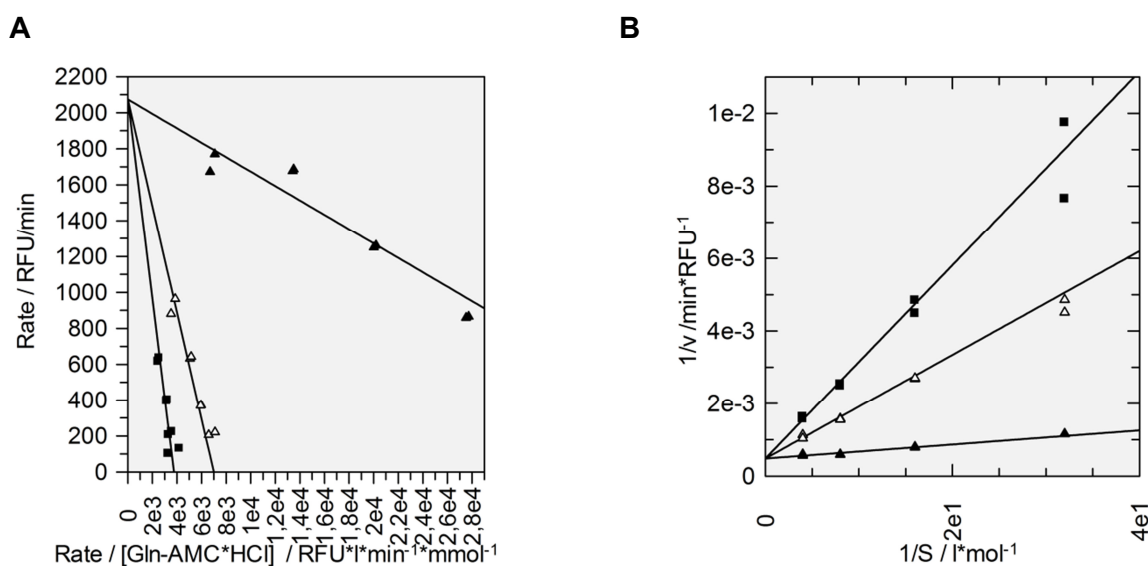


Abbildung 67: (A) Eadie-Hofstee-Diagramm und (B) Doppelt reziproker Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung wichtiger Kinetikparameter der hQC bei kompetitiver Hemmung durch **BSc5136 (73)** bei unterschiedlichen Konzentrationen ■ **[BSc5136 (73)]** = 0,0250mM, Δ **[BSc5136 (73)]** = 0,0125 mM, ▲ ohne Inhibitor.

Innerhalb des Eadie-Hostee-Diagramm entspricht der y-Achsenabschnitt der Maximalgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) und die negativen Steigungen der Regressionsgeraden den Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_M$ ).

Innerhalb des Lineweaver-Burk-Diagramms entspricht der X-Achsenabschnitt dem negativen Kehrwert von  $K_M$  und der y-Achsenabschnitt dem Kehrwert von  $v_{\max}$ . Bei einer kompetitiven Inhibition erhöht sich der  $K_M$ -Wert des Enzyms um einen bestimmten Faktor (Gleichung VII). Es wird von einem apparaten  $K_M$ -Wert ( $K_M^{\text{app}}$ ) gesprochen.

$$K_M^{\text{app}} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot K_M \quad (\text{VIII})$$

Aus den gegebenen Diagrammen und Gleichung (VII) können folgende charakteristische Parameter für die *h*QC und **BSc5136 (73)** bestimmt werden.

Tabelle 39: Wichtige Parameter der kompetitiven Hemmung der *h*QC durch **BSc5136 (73)**.

Parameter	Wert	Standardabweichung
$v_{\max}$ [RFU*min <sup>-1</sup> ]	2073.62	± 57.75
$K_M$ [μM]	40.08	± 3.58
$K_i$ [μM]	1.95	± 0.15

#### 5.6.4 *In vitro* Assay zur Bestimmung der c-Met Inhibition durch Tivantinib (115)

Die Messung der Aktivität von **Tivantinib (115)** gegenüber der c-Met erfolgte durch das französische Dienstleistungsunternehmen *Cerep* nach einer von *Bardelli et al.* entwickelten Prozedur.<sup>[357-358]</sup>

Tabelle 40: *In vitro* Assay Bedingungen zur Bestimmung der c-Met Inhibition.

Assay	c-Met Kinase ( <i>h</i> ) (ref. 2867) <sup>[358]</sup>
Quelle	human rekombinant (Insektenzellen)
Substrat	ATP + ULight-CAGAGAIETDKEYYTVKD (25 nM)
Inkubation	60 min, RT
Gemessener Abschnitt	Phospho-ULight-CAGAGAIETDKEYYTVKD
Detektionsmethode	LANCE® Ultra
Referenzverbindung	Staurosporin IC <sub>50</sub> = 480 nM

Die c-Met Aktivität wird fluorimetrisch mit der LANCE® *Ultra* Methode der Firma *PerkinElmer* bestimmt.<sup>[353]</sup> In Abschnitt 5.6.1 ist die Methode genau erläutert. Das eingesetzte Enzym ist eine humane Rekombinante von c-Met, welches aus Insektenzellen isoliert wird. c-Met wird in Anwesenheit eines potentiellen Inhibitors in folgender Stammlösung für 60 min bei RT inkubiert.

Stammlösung:

- 25 nM spezifisches c-Met Substrat (*ULight* -CAGAGAIETDKEYYTVKD)
- Kinase Puffer (50 mM Hepes [pH 7.5], 150 mM NaCl, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 15 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP

Die Inhibition von c-Met wird aus der Messung der Phosphorylierung des spezifischen Substrats zum Produkt Phospho-*ULight*-CAGAGAIETDKEYYTVKD in Anwesenheit von **Tivantinib (115)**, im Vergleich zum Umsatz der Negativkontrolle (Wasser, DMSO) ermittelt. Als Positivkontrolle wird Staurosporin eingesetzt. Jede Bestimmung wird in Duplikaten gemessen.

### Analyse und Darstellung der Messergebnisse

Für die Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes wird die %-Restaktivität (siehe Abschnitt 5.6.1) in Duplikaten bei acht unterschiedlichen Konzentrationen (300 pM, 1 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 3 µM, 10 µM, 300 µM) gemessen. Die Analyse und Auswertung der Messergebnisse erfolgt durch *Cerep* mittels der nicht-linearen Hill-Funktion (siehe Abschnitt 5.6.1).

### Messergebnisse und Regressionskurven der IC<sub>50</sub>-Bestimmung

Die Messergebnisse der %-Restaktivität der c-Met in Anwesenheit von **Tivantinib (115)** sind in Tabelle 41 zusammengefasst.

Tabelle 41: Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von **Tivantinib (115)** gegenüber c-Met.

Konzentration von Tivantinib (115) [M]	c-Met %-Restaktivität		
	1.	2.	Mittelwert
3.0E-10	-102	0.2	-0.5
1.0E-09	-8.7	2.4	-3.1
1.0E-08	-8.1	-6.9	-7.5
3.0E-08	0.1	4.2	2.2
1.0E-07	-2.5	-3.7	-3.1
3.0E-06	9.5	8.3	8.9
1.0E-05	18.0	15.5	16.8
3.0E-04	77.6	74.7	76.2

Die Auftragung der Messergebnisse erfolgt durch *Cerep* und ist in Abbildung 68 dargestellt.

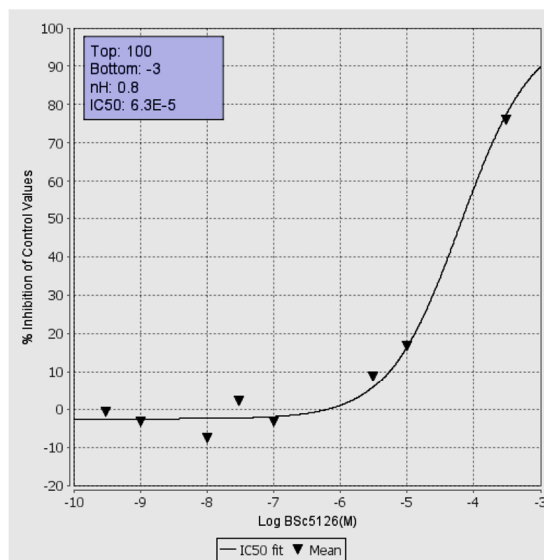


Abbildung 68: Auftragung der gemittelten c-Met %-Restaktivität der gemessenen Duplikate gegenüber der logarithmischen Konzentration von **Tivantinib (115)** sowie die aus der Hill-Funktion angepasste Regressionsgerade. (Anmerkung: **Tivantinib (115)** wurde innerhalb der Messung aufgrund der internen Datenbank zu **BSc5126** umbenannt.)

## 5.7 Allgemeine Angaben zu der *in vitro* Evaluation in AML-Zelllinien

Die *in vitro* Evaluation von **BSc5090 (36)** und **BSc5132** in AML-Zelllinien erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Stegmaier* vom *Dana-Faber Cancer Institute* der *Havard Medical School* in Boston. Sämtliche Experimente wurden von *Lina Benajiba* durchgeführt.

### 5.7.1 Zellkultur

Als Zellen werden HL-60 und NB4 verwendet. Es handelt sich um humane Akute-Promyelozyten-Leukämie-Zelllinien. Die Zellen werden in RPMI-1640 Nährmedium (*Roswell Park Memorial Institute*, RPMI) mit 10% FBS (*fetal bovine serum*, FBS) und 1% Penicillin-Streptomycin bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung gehalten.

### 5.7.2 Western Blot

NB4-Zellen werden für 24 h in unterschiedlichen Konzentrationen von **BSc5090 (36)** (1 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM) sowie DMSO als Kontrolllösung inkubiert. Anschließend werden die Zellen in *Cell Signaling Lysis Puffer* (*Cell Signaling Technology*) mit *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* Tabletten (*Roche Diagnostics*) und *PhosSTOP* Phosphatase Inhibitor (*Roche Diagnostics*) lysiert. Zur Auftrennung des erhaltenen Proteingemisches werden die Proben einer Gelelektrophorese in einem *Novex 4%-12% Bis-Tris Gel* (*Invitrogen*) unterworfen. Danach werden die Gele auf Nitrocellulose Membranen (*Bio-Rad*) transferiert. Um die nicht besetzten Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren, werden die Membranen für 1 h in 5% BSA (*bovine serum albumine*, BSA) Blocklösung (*Sigma Aldrich*) inkubiert. Die Membranen werden mit den primären Antikörpern gegen p-GSK-3α/β (Y279/216) (*Thermo Scientific* # OPA1-03083), GSK-3α (*Cell Signaling Technology* # 9338), GSK-3β (*Cell Signaling Technology* # 9315) und Vinculin (*Abcam* # AB18058) inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation der Membran mit den sekundären Antikörpern *Anti-Rabbit HRP* (*Amersham* # NA9340V) oder *Anti-Mouse HRP* (*Amersham* # NA9310V). Zur Sichtbarmachung der gebundenen Antikörper werden die Membranen mit *Western Lightning Chemiluminescence Substrat* (*Perkin Elmer*) versetzt.

### 5.7.3 Kolonie-Bildungs-Assay

Nach 72 h Vorbehandlung der HL-60- und NB4-Zellen mit 5  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M **BSc5090 (36)**-Lösung werden die Zellen in Methylcellulose (*ClonaCell-TCS* Medium) mit DMSO beschichtet. Die Zellen verbleiben für 7-10 Tage in der Methylcellulose. Anschließend wird die Anzahl der Kolonien mithilfe der Software *ImageQuant TL* gezählt. Es werden zwei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgt mit der Software *PRISM GraphPad*.

### 5.7.4 Morphologische Charakterisierung

HL-60- und NB4-Zellen werden in 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M **BSc5090 (36)**-Lösung sowie DMSO als Kontrolllösung inkubiert. Nach 6 Tagen Inkubation werden Cytospin-Präparate angefertigt und eine May-Grünwald-Giesma Färbung der Präparate durchgeführt. Von drei unabhängigen Experimenten werden repräsentative Bilder am Lichtmikroskop *OLYMPUS BS40* mit einer 100-fachen Vergrößerung unter Ölimmersion mit der Software *SPOT 5.1* aufgenommen.

### 5.7.5 Durchflusszytometrie

HL-60- und NB4-Zellen werden in 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M **BSc5090 (36)**-Lösung sowie DMSO als Kontrolllösung inkubiert. Am 6. Inkubationstag erfolgt die Färbung der Oberflächenmarker CD11b (PE-Cyanine7, *Ebioscience 25-0118-42*), CD11c (APC, *BD Pharmingen 559877*) und CD14 (APC, *Ebioscience 17-0149-42*). Pro Färbung und Konzentration werden je 10 000 Zellen mithilfe des *High Throughput Samplers BD FACSCanto* analysiert. Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten werden mit der Software *FlowJo* ausgewertet.

## 5.8 Allgemeine Angaben zu der *in vivo* Evaluation im Zebrafisch-Embryo

Bei der Durchführung der Assays werden die geltenden Tierschutzbestimmungen und -richtlinien strengstens eingehalten (genauere Erläuterung der Richtlinie siehe 3.1.9). Die Tierhaltung ist im Arbeitskreis seit 2010 etabliert. Dabei werden zwei Arten des Zebraärbblings, der *Danio rerio wild* und der *Danio rerio gold*, gehalten (Abbildung 29).

### 5.8.1 Haltung der adulten Zebrabärblinge

Die Aquarien der adulten Fische stehen in einem durchlüfteten und beheizten Raum mit einer konstanten Raumtemperatur von 26°C. Der Raum besitzt keine Fenster, weshalb ein Zeitschaltuhr-gesteuertes Oberlicht für einen 12 h/12 h Tag/Nacht-Rhythmus sorgt. Ein Standard-Becken enthält eine circa 3 cm dicke Kiesschicht als Bodengrund und verschiedene Aquariumpflanzen (Abbildung 69). Aufgrund des echten Pflanzenbesatzes wird pro Becken eine zusätzliche Lichtquelle benötigt, welche angepasst an das Deckenoberlicht zeitgesteuert ist.



Abbildung 69: *Denio rerio gold* Aquarium mit Kiesschicht, natürlichen Pflanze, Aquariumpumpen und Beleuchtung.

Die Aquarien sind mit einer 50/50 Mischung aus Darmstädter Leitungswasser (Gesamthärte: 17.7 – 20.0 °dH)<sup>[359]</sup> und VE-Wasser gefüllt. Es werden keine Antibiotika oder andere Additive zugesetzt. Für die Aufrechterhaltung der Wasserqualität sind pro Becken zwei Aquarien-Filter (z.B. *Eheim Biopower 160*) im Einsatz. Zusätzlich werden regelmäßige Wasserwechsel und Beckenreinigungen durchgeführt. Menge und Häufigkeit der Wasserwechsel hängen dabei vom Fisch- und Pflanzenbesatz ab.

Der Fischbesatz sollte nicht höher als 0.2 Tiere/Liter sein. Neben den Zebrabärblingen befinden sich gegen den üppigen Algenwuchs auch mindestens 2 algenfressende Fische, wie beispielsweise Black Mollys (*Poecilia sphenops*), in den Becken. Die Tiere werden täglich, mit Ausnahme von Wochenenden, einmal mit trockenem Flockenfutter (*TetraMin* von *Tetra*) und einmal mit Frostfutter (Cyclops, rote oder weiße Mückenlarven von *Zookauf*) gefüttert. Die Tagesration pro Tier liegt bei 1.5 – 3.0 mg Futter. Fütterung, Wasserwechsel und regelmäßige Kontrolle der Wassertemperatur und -qualität wird dokumentiert.



### 5.8.2 Laich-Prozedur

Der Zebrabärbling ist zwischen dem 6. und 24. Monat in der Lage Laich abzulegen.<sup>[311]</sup> Da die adulten Zebrafische den Laich sowie Jungtiere fressen, wird ein Ablauchbecken mit Laichrost der Firma *Aquatic Habitats* verwendet (Abbildung 70). Der Laichrost ist eine spezielle löchrige Einlage, welche zum Schutz vor Laichraub dient.

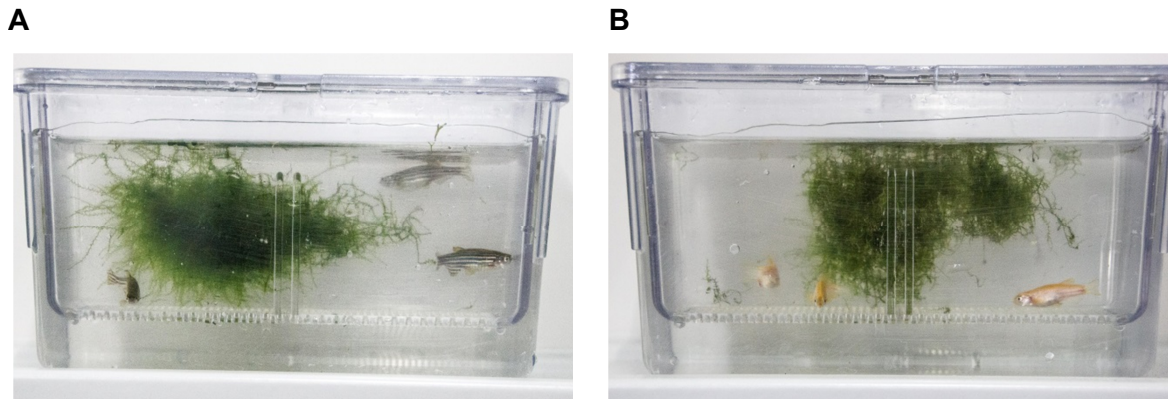


Abbildung 70: Ablauchbecken mit Laichrost. (A) Ablauchbecken mit adulten *Danio rerio wild*. (B) Ablauchbecken mit adulten *Danio rerio gold*.

Ein Paar der adulten Fische wird am Nachmittag vor der Laichablage in ein mit Aquariumwasser befülltes Laichbecken gesetzt und mit Deckung-bietenden Kunststoffpflanzen oder Moos bestückt. Das Laichbecken muss anschließend gut abgedeckt werden. Am nächsten Morgen kommt es naturgemäß zur Laichablage. Dabei kleben die Eier nicht und fallen durch den Laichrost zu Boden. Gegen Mittag werden die adulten Tiere wieder zurück in ihr ursprüngliches Aquarium gesetzt. Nach Entfernen des Laichrosts können die Eier entnommen werden. Dazu wird das Wasser zuerst kurz aufgewirbelt. Wenn die Eier wieder auf dem Boden liegen, der Dreck aber noch schwimmt, wird das dreckige Wasser bis auf einen kleinen Rest über ein Plastik-Teesieb abgosses. Anschließend wird das restliche Wasser inklusive der Eier in eine Petrischale gegeben. Bei zu frühem Wechseln des Fischwassers durch Nährmedium kommt es zum Absterben der Embryos. Der Zustand der sogenannten 50%-igen Epibolie ist der frühestmögliche Zeitpunkt des Medium-Wechsels, da die Blastula des Embryos eine gleichmäßige Dicke erreicht hat und dadurch der Organismus weniger anfällig ist. Beim Zebrafisch-Embryo ist die 50%-ige Epibolie nach 5 hpf erreicht. Zur Sicherheit wird das Fischwasser jedoch erst nach 1 dpf nach dreimaliger Waschprozedur durch E3-Medium (siehe Abschnitt 5.8.3) gewechselt. Zugleich werden auch sterile Eier und Dreck am Lichtmikroskop aussortiert. Entsprechend der



anschließenden Verwendung werden die Embryonen entweder in Petrischalen oder 24-well Mikrotiterplatten überführt.

### 5.8.3 E3-Medium zur Arbeit mit Zebrafisch-Embryonen

Das verwendete Protokoll für das sogenannte E3-Medium stammt aus dem Buch *Zebrafisch* von Nüsslein-Volhard und Dahm.<sup>[311]</sup>

Das E3-Medium setzt sich zusammen aus:

- 5 mM NaCl
- 0.17 mM KCl
- 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>
- 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>
- 10<sup>-5</sup> % Methylenblau

Das E3-Medium kann als 60-fach-konzentrierte (60x)-Stammlösung ohne Methylenblau vorbereitet und im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Für 10 L der 60x-Stammlösung werden folgende Mengen in VE-Wasser gelöst:

- 172.0 g NaCl
- 7.6 g KCl
- 29.0 g CaCl<sub>2</sub>•2 H<sub>2</sub>O
- 49.0 g MgSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O

Um 1x E3-Medium zu erhalten werden 160 mL der 60x-Stammlösung auf 10 L mit VE-Wasser aufgefüllt und 30 mL einer 0.01%-igen Methylenblau-Lösung als Fungizid hinzugegeben. 1x E3-Medium kann über mehrere Wochen bei RT aufbewahrt werden.

### 5.8.4 Nachzucht

Der Bestand der adulten Zebrabärblinge wird durch regelmäßige Nachzucht aufrecht gehalten. Auf den Kauf von adulten Tieren aus dem Aquaristik-Handel wird aufgrund des hohen Risikos eines Keim-Eintrags verzichtet.

Die Nachzucht wird innerhalb der ersten 7 dpf in Petrischalen bei 27°C gehalten. Für eine leichte Durchmischung werden die Petrischalen auf einem Kreisschüttler (*Incubating Microplate Shaker* der Firma VWR) bei niedrigster Stufe gerüttelt. Bei der Laichprozedur werden die Eier nach 1 dpf in E3-Medium überführt. Anschließend wird das E3-Medium täglich nach dreimaliger Waschprozedur ausgetauscht. Am 3 dpf haben sich die Embryonen vom Chorion befreit und die zurückbleibenden Eierschalen

müssen aus dem Nährmedium entfernt werden. Am 7 dpf werden die Larven in ein mit E3-Medium gefülltes, größeres Becken überführt.

Die Jungtiere werden anfangs mit Staubfutter (*TetraMinBaby* von *Tetra*), nach etwa 14 dpf mit gröberem Staubfutter (*Granocolor mini* von *JBL*) und nach 40 dpf mit normalem Trockenfutter (*TetraMin* von *Tetra*) gefüttert. Zusätzlich wird dreimal die Woche Cyclops-Frostfutter (*Zookauf*) gegeben.

Nach circa 1 Monat werden die Jungtiere in kleinere Becken mit normalem Fischwasser überführt (Abbildung 71). In den Becken befinden sie immer noch nur Jungtiere und keine adulten Fische.

**A**



**B**



Abbildung 71: Kinderstube der Jungtiere. Kleine Becken mit normalem Fischwasser und sanfteren Pumpen.

Nach circa 3 Monaten sind die Jungtiere groß genug und können in die großen Becken zu den anderen adulten Fischen umgesiedelt werden.

### 5.8.5 Phänotyp-basiertes Zebrafisch-Embryonen Assay

Das Phänotyp-basierte Zebrafisch-Embryonen Assay kann mit Embryonen des *Danio rerio wild* oder des *Danio rerio gold* durchgeführt werden. Die von der Laichprozedur erhaltenen Eier werden innerhalb der ersten 24 hpf in Fischwasser bei 26°C aufbewahrt. Nach 24 hpf werden sterile Eier aussortiert und die gesunden Embryonen in E3-Medium in 24-well Mikrotiterplatten überführt. Die zu testende Substanz wird in E3-Medium mit höchstens 2 Vol% DMSO als Lösungsvermittler gelöst. Das E3-Medium in den Mikrotiterplatten wird zugleich gegen unterschiedliche Konzentrationen der zu testenden Substanz ausgetauscht. Die Zebrafisch-Larven werden bis zum 5 dpf in den Wirkstofflösungen inkubiert, sodass die Wirkstoffe von

---

den Larven über das umgebene wässrige Medium aufgenommen werden können. Als Kontrolle dienen Embryonen in E3-Medium mit dem gleichen Volumenanteil an DMSO. Jede Wirkstoff-Konzentrationsreihe inklusive Kontrolllösung wird in Duplikaten mit je 5 Embryonen pro Replikat durchgeführt. Während der 5 Tage wird die Entwicklung der Embryonen sowie die Ausbildung möglicher Phänotypen an einem *StereoBlue Bino Zoom* Mikroskop der Firma *Euromex* regelmäßig beobachtet und dokumentiert. Repräsentative Bilder der entstandenen Phänotypen werden mithilfe einer *Nikon D5000* Kamera aufgezeichnet.

---

## Literaturverzeichnis

---

- [1] G. Brittinger, G. Cohnen, D. Hossfeld, D. Huhn, E. König, J. Obrecht, J. Fastetter, H. Seidel, H. Thöml, H. Begemann, *Blut und Blutkrankheiten: Teil 6 Leukämien*, Vol. 2, Springer-Verlag, **2013**.
- [2] R. Virchow, *Archiv für pathologische Anatomie* **1847**, 1, 563.
- [3] <http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/leukaemie/definition-und-haeufigkeit.html>, Zugriff: 19.12.2015.
- [4] D. W. Guido Westerwelle, *Zwischen zwei Leben Von Liebe, Tod und Zuversicht.*, Hoffmann und Campe Verlag GmbH, Hamburg, **2015**.
- [5] *Krebs in Deutschland 2011/2012*, Vol. 10. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin, **2015**.
- [6] E. Estey, H. Döhner, *The Lancet*, 368, 1894-1907.
- [7] M. A. Rieger, T. Schroeder, *Biospectrum-Heidelberg* **2007**, 13, 254.
- [8] C. Riether, C. M. Schurch, A. F. Ochsenbein, *Cell Death and Differentiation* **2015**, 22, 187-198.
- [9] E. Passequé, C. H. M. Jamieson, L. E. Ailles, I. L. Weissman, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100, 11842-11849.
- [10] W. Lento, K. Congdon, C. Voermans, M. Kitzik, T. Reya, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2013**, 5.
- [11] S. J. Morrison, I. L. Weissman, *Immunity* **1994**, 1, 661-673.
- [12] E. Elert, *Nature* **2013**, 498, S2-S3.
- [13] M. Kondo, I. L. Weissman, K. Akashi, *Cell* **1997**, 91, 661-672.
- [14] K. Akashi, D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman, *Nature* **2000**, 404, 193-197.
- [15] T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri, J. E. Dick, *Nature* **1994**, 367, 645-648.
- [16] B. J. P. Huntly, D. G. Gilliland, *Nature Reviews Cancer* **2005**, 5, 311-321.
- [17] L. I. Shlush, S. Zandi, A. Mitchell, W. C. Chen, J. M. Brandwein, V. Gupta, J. A. Kennedy, A. D. Schimmer, A. C. Schuh, K. W. Yee, J. L. McLeod, M. Doedens, J. J. F. Medeiros, R. Marke, H. J. Kim, K. Lee, J. D. McPherson, T. J. Hudson, T. H. Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, A. M. K. Brown, Q. M. Trinh, L. D. Stein, M. D. Minden, J. C. Y. Wang, J. E. Dick, *Nature* **2014**, 506, 328-333.
- [18] J. W. Vardiman, J. Thiele, D. A. Arber, R. D. Brunning, M. J. Borowitz, A. Porwit, N. L. Harris, M. M. Le Beau, E. Hellström-Lindberg, A. Tefferi, C. D. Bloomfield, *Blood* **2009**, 114, 937-951.

- [19] J. M. Bennett, D. Catovsky, M.-T. Daniel, G. Flandrin, D. A. G. Galton, H. R. Gralnick, C. Sultan, *British Journal of Haematology* **1976**, 33, 451-458.
- [20] J. M. Bennett, D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. G. Galton, H. R. Gralnick, C. Sultan, *Annals of Internal Medicine* **1985**, 103, 620-625.
- [21] <http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/aml/klassifikation/>, Zugriff: 28.01.2016.
- [22] A. Nennecke, A. Wienecke, K. Kraywinkel, *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **2014**, 57, 93-102.
- [23] M. Schaich, G. Ehninger, *Onkologie* **2006**, 12, 1003-1011.
- [24] A. K. C. H. Brandts, H. Serve, *Die Akute Myeloische Leukämie (AML) des Erwachsenen, Vol. 1*, Kompetenznetz akute und chronische Leukämien, Frankfurt, **2010**.
- [25] U. Bacher, C. Haferlach, S. Schnittger, W. Kern, M. Ott, T. Haferlach, *Der Pathologe* **2012**, 33, 528-538.
- [26] N. Barber, S. Gez, L. Belov, S. P. Mulligan, A. Woolfson, R. I. Christopherson, *FEBS Letters* **2009**, 583, 1785-1791.
- [27] K. Mrózek, K. Heinonen, C. D. Bloomfield, *Best Practice & Research Clinical Haematology* **2001**, 14, 19-47.
- [28] D. Grimwade, R. K. Hills, A. V. Moorman, H. Walker, S. Chatters, A. H. Goldstone, K. Wheatley, C. J. Harrison, A. K. Burnett, *Blood* **2010**, 116, 354-365.
- [29] F. R. Appelbaum, H. Gundacker, D. R. Head, M. L. Slovak, C. L. Willman, J. E. Godwin, J. E. Anderson, S. H. Petersdorf, *Blood* **2006**, 107, 3481-3485.
- [30] A. Cagnetta, S. Adamia, C. Acharya, F. Patrone, M. Miglino, A. Nencioni, M. Gobbi, M. Cea, *Leukemia Research* **2014**, 38, 649-659.
- [31] T. Naoe, H. Kiyoi, *International journal of hematology* **2013**, 97, 165-174.
- [32] M. R. O'Donnell, C. N. Abboud, J. Altman, F. R. Appelbaum, D. A. Arber, E. Attar, U. Borate, S. E. Coutre, L. E. Damon, S. Goorha, J. Lancet, L. J. Maness, G. Marcucci, M. M. Millenson, J. O. Moore, F. Ravandi, P. J. Shami, B. D. Smith, R. M. Stone, S. A. Strickland, M. S. Tallman, E. S. Wang, M. Naganuma, K. M. Gregory, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* **2012**, 10, 984-1021.
- [33] C. M. S. Brown, S. R. Larsen, H. J. Iland, D. E. Joshua, J. Gibson, *Internal Medicine Journal* **2012**, 42, 1179-1186.
- [34] T. Neumann, Master-Thesis, Technische Universität Darmstadt (Darmstadt), **2013**.
- [35] K. Maurer, S. Volk, H. Gerbaldo, *The Lancet*, 349, 1546-1549.
- [36] K. Maurer, U. Maurer, *Alzheimer. Das Leben eines Arztes und die Karriere einer Krankheit*, Piper, München, **1998**.

- 
- [37] A. Alzheimer, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* **1907**, 146-148.
- [38] E. Kraepelin, *Psychiatrie; ein Lehrbuch für Studierende und Aerzte: Klinische Psychiatrie*, Vol. 2, Barth, **1910**.
- [39] M. Prince, A. Wimo, M. Guerchet, G. Ali, Y. Wu, M. Prina, *World Alzheimer Report 2015. The global impact of dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*, Alzheimer's Disease International, London, **2015**.
- [40] [https://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/faktenblatt\\_zahlen.htm](https://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/faktenblatt_zahlen.htm), Zugriff: 15.02.2016.
- [41] <https://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/risikofaktoren.htm>, Zugriff: 15.2.2016.
- [42] <http://de.statista.com/themen/653/demografischer-wandel/>, Zugriff: 15.02.2016.
- [43] H. F. Claus-Werner Wallesch, *Demenz*, Vol. 2. aktualisierte und überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart, **2012**.
- [44] M. DiLuca, J. Olesen, *Neuron*, 82, 1205-1208.
- [45] B. J. Joseph Gaugler, Tricia Johnson, Ken Scholz, Jennifer Weuve,, *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* **2015**, 11, 332-384.
- [46] [http://www.alzheimerinfo.de/alzheimer/demenz\\_alzheimer/index.jsp](http://www.alzheimerinfo.de/alzheimer/demenz_alzheimer/index.jsp), Zugriff: 13.01.2013.
- [47] M. Nehls, *Die Alzheimer-Lüge: Die Wahrheit über eine vermeidbare Krankheit*, Heyne Verlag, München, **2014**.
- [48] G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, E. M. Stadlan, *Neurology* **1984**, 34, 939.
- [49] G. M. McKhann, D. S. Knopman, H. Chertkow, B. T. Hyman, C. R. Jack Jr, C. H. Kawas, W. E. Klunk, W. J. Koroshetz, J. J. Manly, R. Mayeux, R. C. Mohs, J. C. Morris, M. N. Rossor, P. Scheltens, M. C. Carrillo, B. Thies, S. Weintraub, C. H. Phelps, *Alzheimer's & Dementia* **2011**, 7, 263-269.
- [50] R. Jakob-Roetne, H. Jacobsen, *Angewandte Chemie* **2009**, 121, 3074-3105.
- [51] M. Sjobeck, M. Haglund, E. Englund, *International journal of geriatric psychiatry* **2005**, 20, 919-926.
- [52] J. L. Price, J. C. Morris, *Annals of Neurology* **1999**, 45, 358-368.
- [53] L. M. Ittner, J. Götz, *Nature Reviews Neuroscience* **2011**, 12, 67-72.
- [54] D. Kieser, kumulative Dissertation, Technische Universität Darmstadt (Darmstadt), **2011**.
- [55] A. Nordberg, J. O. Rinne, A. Kadir, B. Langstrom, *Nature Reviews Neurology* **2010**, 6, 78-87.

- [56] K. A. Johnson, K. Jones, B. L. Holman, J. A. Becker, P. A. Spiers, A. Satlin, M. S. Albert, *Neurology* **1998**, *50*, 1563-1571.
- [57] K. A. Johnson, M. F. Kijewski, J. A. Becker, B. Garada, A. Satlin, B. L. Holman, *Journal of Nuclear Medicine* **1993**, *34*, 2044-2048.
- [58] M. Koronyo-Hamaoui, Y. Koronyo, A. V. Ljubimov, C. A. Miller, M. K. Ko, K. L. Black, M. Schwartz, D. L. Farkas, *NeuroImage* **2011**, *54*, Supplement 1, S204-S217.
- [59] L. Gasparini, R. Anthony Crowther, K. R. Martin, N. Berg, M. Coleman, M. Goedert, M. G. Spillantini, *Neurobiology of Aging* **2011**, *32*, 419-433.
- [60] M. F. Cordeiro, L. Guo, K. M. Coxon, J. Duggan, S. Nizari, E. M. Normando, S. L. Sensi, A. M. Sillito, F. W. Fitzke, T. E. Salt, S. E. Moss, *Cell Death and Disease* **0000**, *1*, e3.
- [61] I. Hilger, Kaiser, Werner A., (Carl Zeiss Meditec AG) DE102009043750 A1, **2011**.
- [62] J. E. Morley, S. A. Farr, *Biochemical Pharmacology* **2014**, *88*, 479-485.
- [63] G. G. Glenner, C. W. Wong, *Biochemical and biophysical research communications* **1984**, *122*, 1131-1135.
- [64] C. Priller, T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. A. Kretschmar, J. Herms, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2006**, *26*, 7212-7221.
- [65] W. A. and, B. D. Strooper, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2002**, *18*, 25-51.
- [66] F. M. LaFerla, K. N. Green, S. Oddo, *Nature Reviews Neuroscience* **2007**, *8*, 499-509.
- [67] S. F. Lichtenthaler, C. Haass, *The Journal of Clinical Investigation*, *113*, 1384-1387.
- [68] M. Maqbool, M. Mobashir, N. Hoda, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *107*, 63-81.
- [69] D. J. Selkoe, *Annals of the New York Academy of Sciences* **2000**, *924*, 17-25.
- [70] R. B. DeMattos, K. R. Bales, D. J. Cummins, J.-C. Dodart, S. M. Paul, D. M. Holtzman, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 8850-8855.
- [71] G. Bitan, M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek, D. B. Teplow, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 330-335.
- [72] G. Bitan, S. S. Vollers, D. B. Teplow, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 34882-34889.
- [73] M. P. Mazanetz, P. M. Fischer, *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, *6*, 464-479.
- [74] D. N. Drechsel, A. A. Hyman, M. H. Cobb, M. W. Kirschner, *Molecular Biology of the Cell* **1992**, *3*, 1141-1154.
- [75] K. R. Brunden, J. Q. Trojanowski, V. M. Y. Lee, *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, *8*, 783-793.
- [76] A. Schneider, E. Mandelkow, *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 443-457.



- [77] S.-R. Ryoo, H. K. Jeong, C. Radnaabazar, J.-J. Yoo, H.-J. Cho, H.-W. Lee, I.-S. Kim, Y.-H. Cheon, Y. S. Ahn, S.-H. Chung, W.-J. Song, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282, 34850-34857.
- [78] W. Maier, *Alzheimer & Demenzen verstehen: Diagnose, Behandlung, Alltag, Betreuung*, Georg Thieme Verlag, **2010**.
- [79] H.-J. F. Prof. Dr. Alexander Kurz, Susanna Saxl, Ellen Nickel, *Demenz. Das Wichtigste, Vol. 1*, Deutsche Alzheimer Gesellschaft e. V., Selbsthilfe Demenz, Berlin, **2015**.
- [80] <https://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/behandlung.htm>, Zugriff: 11.02.2016.
- [81] P. T. Francis, A. M. Palmer, M. Snape, G. K. Wilcock, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **1999**, 66, 137-147.
- [82] G. A. Martinez, D. I. Dorronsoro, A. L. Rubio, G. D. Alonso, H. A. Fuertes, S. Morales-Alcelay, M. M. M. Del, P. E. Garcia, E. P. Usan, A. C. De, P. M. Medina, (*Neuropharma, S.A., Spain; Ruffles, Graham Keith .*) **2004**.
- [83] J. Tihi, M. Meleh, F. Vrecer, R. Zupet, J. Pucelj, M. Pelko, (*KRKA, Slovenia .*) EP1908748A1, **2008**.
- [84] <http://www.aricept.com/>, Zugriff: 10.03.2013.
- [85] <http://www.razadyneer.com/>, Zugriff: 10.03.2013.
- [86] <http://www.pharma.us.novartis.com/cs/www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/exelon.pdf>, Zugriff: 10.03.2013.
- [87] <http://www.namenda.com/>, Zugriff: 10.03.2013.
- [88] G. Möller, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i.Br. (Freiburg i.Br.), **2002**.
- [89] M. S. Rafii, P. S. Aisen, *BMC Medicine* **2015**, 13, 1-7.
- [90] L. S. Schneider, F. Mangialasche, N. Andreasen, H. Feldman, E. Giacobini, R. Jones, V. Mantua, P. Mecocci, L. Pani, B. Winblad, M. Kivipelto, *Journal of internal medicine* **2014**, 275, 251-283.
- [91] S. Misra, B. Medhi, *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* **2013**, 34, 831-839.
- [92] [http://www.alzforum.org/therapeutics/search?fda\\_statuses=&target\\_types\[\]=170&therapy\\_types=&conditions\[\]=145&keywords-entry=&keywords=](http://www.alzforum.org/therapeutics/search?fda_statuses=&target_types[]=170&therapy_types=&conditions[]=145&keywords-entry=&keywords=), Zugriff: 16.02.2016.
- [93] F. Gervais, J. Paquette, C. Morissette, P. Krzywkowski, M. Yu, M. Azzi, D. Lacombe, X. Kong, A. Aman, J. Laurin, W. A. Szarek, P. Tremblay, *Neurobiology of Aging* **2007**, 28, 537-547.
- [94] Z. M. Svedruzic, K. Popovic, V. Sendula-Jengic, *PLoS One* **2013**, 8, e50759.



- [95] A. M. Schmidt, B. Sahagan, R. B. Nelson, J. Selmer, R. Rothlein, J. M. Bell, *Current Opinion in Investigational Drugs* **2009**, 10.
- [96] M. Citron, *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, 9, 387-398.
- [97] <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01739348>, Zugriff: 12.02.2016.
- [98] <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01953601>, Zugriff: 12.02.2016.
- [99] <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT02245737>, Zugriff: 12.02.2016.
- [100] <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02565511>, Zugriff: 12.02.2016
- [101] <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01900665>, Zugriff: 12.02.2016.
- [102] <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01127633>, Zugriff: 12.02.2016.
- [103] <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01998841>, Zugriff: 12.02.2016.
- [104] <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT02080364>, Zugriff: 12.02.2016.
- [105] E. Giacobini, G. Gold, *Nature Reviews Neurology* **2013**, 9, 677-686.
- [106] M. Medina, J. Avila, *Biochemical Pharmacology* **2014**, 88, 540-547.
- [107] D. A. Snowdon, *Annals of Internal Medicine* **2003**, 139, 450-454.
- [108] B. Grüber, *Deutsches Arzteblatt International* **2012**, 109, 26-28.
- [109] M. Bobinski, J. Wegiel, H. M. Wisniewski, M. Tarnawski, M. Bobinski, B. Reisberg, M. J. De Leon, D. C. Miller, *Neurobiology of Aging* **1996**, 17, 909-919.
- [110] K. SantaCruz, J. Lewis, T. Spires, J. Paulson, L. Kotilinek, M. Ingelsson, A. Guimaraes, M. DeTure, M. Ramsden, E. McGowan, C. Forster, M. Yue, J. Orne, C. Janus, A. Mariash, M. Kuskowski, B. Hyman, M. Hutton, K. H. Ashe, *Science* **2005**, 309, 476-481.
- [111] S. Le Corre, H. W. Klafki, N. Plesnila, G. Hübinger, A. Obermeier, H. Sahagún, B. Monse, P. Seneci, J. Lewis, J. Eriksen, C. Zehr, M. Yue, E. McGowan, D. W. Dickson, M. Hutton, H. M. Roder, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, 103, 9673-9678.
- [112] J. Q. Trojanowski, V. M. Y. Lee, *Nature Neuroscience* **2005**, 8, 1136-1137.
- [113] M. Rapoport, H. N. Dawson, L. I. Binder, M. P. Vitek, A. Ferreira, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, 6364-6369.
- [114] G. S. Bloom, *JAMA Neurology* **2014**, 71, 505-508.
- [115] G. Larbig, Dissertation, Technischen Universität Darmstadt (Darmstadt), **2007**.
- [116] <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01689246>, Zugriff: 12.02.2016.
- [117] <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01689233>, Zugriff: 12.02.2016.
- [118] D. P. Hanger, B. H. Anderton, W. Noble, *Trends in Molecular Medicine* **2009**, 15, 112-119.
- [119] J.-Z. Wang, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *European Journal of Neuroscience* **2007**, 25, 59-68.

- [120] P. Cohen, S. Frame, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001**, 2, 769-776.
- [121] R. V. Bhat, S. L. Budd Haeberlein, J. Avila, *Journal of Neurochemistry* **2004**, 89, 1313-1317.
- [122] F. Vanleuven, *Frontiers in Molecular Neuroscience* **2011**, 4.
- [123] T. del Ser, K. C. Steinwachs, H. J. Gertz, M. V. Andres, B. Gomez-Carrillo, M. Medina, J. A. Vericat, P. Redondo, D. Fleet, T. Leon, *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2013**, 33, 205-215.
- [124] J. M. Domínguez, A. Fuertes, L. Orozco, M. del Monte-Millán, E. Delgado, M. Medina, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, 287, 893-904.
- [125] A. Bretteville, E. Planel, *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2008**, 14, 431-436.
- [126] E. E. Congdon, K. E. Duff, *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2008**, 14, 453-457.
- [127] J.-E. Avila, Gonzalo, E. Garca, V. Garca-Escudero, F. Hernandez, J. DeFelipe, *International Journal of Alzheimer & Disease* **2012**, 2012, 7.
- [128] B. Su, X. Wang, K. L. Drew, G. Perry, M. A. Smith, X. Zhu, *Journal of Neurochemistry* **2008**, 105, 2098-2108.
- [129] <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT02031198>, Zugriff: 15.02.2016.
- [130] [http://www.alzforum.org/therapeutics/search?fda\\_statuses=&target\\_types\[\]=177&therapy\\_types=&conditions\[\]=145&keywords-entry=&keywords=](http://www.alzforum.org/therapeutics/search?fda_statuses=&target_types[]=177&therapy_types=&conditions[]=145&keywords-entry=&keywords=), Zugriff: 16.02.2016.
- [131] <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01966666>, Zugriff: 12.02.2016.
- [132] O. Kaidanovich-Beilin, J. R. Woodgett, *Frontiers in Molecular Neuroscience* **2011**, 4, 1-40.
- [133] E. ter Haar, J. T. Coll, D. A. Austen, H.-M. Hsiao, L. Swenson, J. Jain, *Nature Structure and Molecular Biology* **2001**, 8, 593-596.
- [134] R. Dajani, E. Fraser, S. M. Roe, N. Young, V. Good, T. C. Dale, L. H. Pearl, *Cell* **2001**, 105, 721-732.
- [135] N. Embi, D. B. Rylatt, P. Cohen, *European Journal of Biochemistry* **1980**, 107, 519-527.
- [136] J. R. Vandenheede, S. D. Yang, J. Goris, W. Merlevede, *Journal of Biological Chemistry* **1980**, 255, 11768-11774.
- [137] N. Tejeda-Muñoz, M. Robles-Flores, *IUBMB Life* **2015**, 67, 914-922.
- [138] V. W. Ding, R.-H. Chen, F. McCormick, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 32475-32481.
- [139] R. S. Jope, G. V. W. Johnson, *Trends in Biochemical Sciences* **2004**, 29, 95-102.
- [140] M. Medina, J. Avila, *The Role of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) in Alzheimer's Disease in Alzheimer's Disease Pathogenesis-Core Concepts, Shifting Paradigms and Therapeutic Targets*, INTECH, Rijeka, **2011**, pp. 197-222.
- [141] J. R. Woodgett, *The EMBO Journal* **1990**, 9, 2431-2438.

- [142] K. F. Lau, C. C. J. Miller, B. H. Anderton, P. C. Shaw, *The Journal of Peptide Research* **1999**, *54*, 85-91.
- [143] P. C. Shaw, A. F. Davies, K. F. Lau, M. Garcia-Barcelo, M. M. Waye, S. Lovestone, C. C. Miller, B. H. Anderton, *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* **1998**, *41*, 720-727.
- [144] S. Frame, P. Cohen, *Biochemical Journal* **2001**, *359*, 1-16.
- [145] J. A. McCubrey, L. S. Steelman, F. E. Bertrand, N. M. Davis, M. Sokolosky, S. L. Abrams, G. Montalto, A. B. D'Assoro, M. Libra, F. Nicoletti, R. Maestro, J. Basecke, D. Rakus, A. Gizak, Z. Demidenko, L. Cocco, A. M. Martelli, M. Cervello, *Oncotarget* **2014**, *5*, 2881-2911.
- [146] K. P. Hoeflich, J. Luo, E. A. Rubie, M.-S. Tsao, O. Jin, J. R. Woodgett, *Nature* **2000**, *406*, 86-90.
- [147] K. MacAulay, B. W. Doble, S. Patel, T. Hansotia, E. M. Sinclair, D. J. Drucker, A. Nagy, J. R. Woodgett, *Cell Metabolism* **2007**, *6*, 329-337.
- [148] B. Bax, P. S. Carter, C. Lewis, A. R. Guy, A. Bridges, R. Tanner, G. Pettman, C. Mannix, A. A. Culbert, M. J. B. Brown, D. G. Smith, A. D. Reith, *Structure* **2001**, *9*, 1143-1152.
- [149] A. C. Ana Martinez, Miguel Medina, *Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) and Its Inhibitors: Drug Discovery and Development*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2006**.
- [150] G. Klebe, *Wirkstoffdesign*, 2nd ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [151] V. Palomo, I. Soteras, D. I. Perez, C. Perez, C. Gil, N. E. Campillo, A. Martinez, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 8461-8470.
- [152] C. Sutherland, I. A. Leighton, P. Cohen, *Biochemical Journal* **1993**, *296*, 15-19.
- [153] G. M. Thomas, S. Frame, M. Goedert, I. Nathke, P. Polakis, P. Cohen, *FEBS Letters* **1999**, *458*, 247-251.
- [154] t. H. Ernst, J. T. Coll, D. A. Austen, H.-M. Hsiao, L. Swenson, J. Jain, *Nature Structure and Biology* **2001**, *8*, 593-596.
- [155] K. Hughes, E. Nikolakaki, S. E. Plyte, N. F. Totty, J. R. Woodgett, *The EMBO Journal* **1993**, *12*, 803-808.
- [156] P. A. Lochhead, R. Kinstrie, G. Sibbet, T. Rawjee, N. Morrice, V. Cleghon, *Molecular Cell* **2006**, *24*, 627-633.
- [157] A. Cole, S. Frame, P. Cohen, *The Biochemical journal* **2004**, *377*, 249-255.
- [158] C. Sutherland, P. Cohen, *FEBS Letters* **1994**, *338*, 37-42.
- [159] S. Frame, P. Cohen, R. M. Biondi, *Molecular Cell* **2001**, *7*, 1321-1327.
- [160] Muhammet F. Gulen, K. Bulek, H. Xiao, M. Yu, J. Gao, L. Sun, E. Beurel, O. Kaidanovich-Beilin, Paul L. Fox, Paul E. DiCorleto, J.-a. Wang, J. Qin, David N. Wald,

- James R. Woodgett, Richard S. Jope, J. Carman, A. Dongre, X. Li, *Immunity* **2012**, 37, 800-812.
- [161] E. Beurel, S. F. Grieco, R. S. Jope, *Pharmacology & Therapeutics* **2015**, 148, 114-131.
- [162] N. Goode, K. Hughes, J. R. Woodgett, P. J. Parker, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 16878-16882.
- [163] J. Brognard, E. Sieracki, T. Gao, A. C. Newton, *Molecular Cell* **2007**, 25, 917-931.
- [164] D. A. E. Cross, D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, B. A. Hemmings, *Nature* **1995**, 378, 785-789.
- [165] G. N. Bijur, R. S. Jope, *Neuroreport* **2003**, 14, 2415-2419.
- [166] G. N. Bijur, R. S. Jope, *Journal of Neurochemistry* **2003**, 87, 1427-1435.
- [167] J. A. Diehl, M. Cheng, M. F. Roussel, C. J. Sherr, *Genes and Development* **1998**, 12, 3499-3511.
- [168] G. N. Bijur, R. S. Jope, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 37436-37442.
- [169] G. P. Meares, R. S. Jope, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282, 16989-17001.
- [170] I. Azoulay-Alfaguter, Y. Yaffe, A. Licht-Murava, M. Urbanska, J. Jaworski, S. Pietrokovski, K. Hirschberg, H. Eldar-Finkelman, *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286, 13470-13480.
- [171] S. Ikeda, S. Kishida, H. Yamamoto, H. Murai, S. Koyama, A. Kikuchi, *The EMBO Journal* **1998**, 17, 1371-1384.
- [172] S. Röhrs, O. Müller, A. Wittinghofer, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (Bochum), **2007**.
- [173] T. Reya, H. Clevers, *Nature* **2005**, 434, 843-850.
- [174] F. Takahashi-Yanaga, *Biochemical Pharmacology* **2013**, 86, 191-199.
- [175] B. W. Doble, S. Patel, G. A. Wood, L. K. Kockeritz, J. R. Woodgett, *Developmental Cell*, 12, 957-971.
- [176] H. Benchabane, E. G. Hughes, C. M. Takacs, J. R. Baird, Y. Ahmed, *Development (Cambridge, England)* **2008**, 135, 963-971.
- [177] E. Lee, A. Salic, R. Kruger, R. Heinrich, M. W. Kirschner, *PLoS biology* **2003**, 1, E10.
- [178] L. Zeng, F. Fagotto, T. Zhang, W. Hsu, T. J. Vasicek, W. L. Perry, 3rd, J. J. Lee, S. M. Tilghman, B. M. Gumbiner, F. Costantini, *Cell* **1997**, 90, 181-192.
- [179] M. J. Hart, R. de los Santos, I. N. Albert, B. Rubinfeld, P. Polakis, *Current biology : CB* **1998**, 8, 573-581.
- [180] S. Ikeda, S. Kishida, H. Yamamoto, H. Murai, S. Koyama, A. Kikuchi, *The EMBO Journal* **1998**, 17, 1371-1384.
- [181] S. Amit, A. Hatzubai, Y. Birman, J. S. Andersen, E. Ben-Shushan, M. Mann, Y. Ben-Neriah, I. Alkalay, *Genes and Development* **2002**, 16, 1066-1076.

- [182] T. Hagen, A. Vidal-Puig, *Biochemical and biophysical research communications* **2002**, 294, 324-328.
- [183] C. Liu, Y. Li, M. Semenov, C. Han, G.-H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin, X. He, *Cell* **2002**, 108, 837-847.
- [184] H. Aberle, A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, R. Kemler, *The EMBO Journal* **1997**, 16, 3797-3804.
- [185] R. A. Cavallo, R. T. Cox, M. M. Moline, J. Roose, G. A. Polevoy, H. Clevers, M. Peifer, A. Bejsovec, *Nature* **1998**, 395, 604-608.
- [186] J. Roose, M. Molenaar, J. Peterson, J. Hurenkamp, H. Brantjes, P. Moerer, M. van de Wetering, O. Destree, H. Clevers, *Nature* **1998**, 395, 608-612.
- [187] J. Sierra, T. Yoshida, C. A. Joazeiro, K. A. Jones, *Genes & Development* **2006**, 20, 586-600.
- [188] K. Willert, K. A. Jones, *Genes & Development* **2006**, 20, 1394-1404.
- [189] X. He, M. Semenov, K. Tamai, X. Zeng, *Development (Cambridge, England)* **2004**, 131, 1663-1677.
- [190] L. Li, H. Yuan, C. D. Weaver, J. Mao, G. H. Farr, D. J. Sussman, J. Jonkers, D. Kimelman, D. Wu, *The EMBO Journal* **1999**, 18, 4233-4240.
- [191] J. R. Miller, R. T. Moon, *The Journal of Cell Biology* **1997**, 139, 229-243.
- [192] J. Behrens, J. P. von Kries, M. Kuhl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl, W. Birchmeier, *Nature* **1996**, 382, 638-642.
- [193] M. Caspi, A. Zilberberg, H. Eldar-Finkelman, R. Rosin-Arbesfeld, *Oncogene* **2008**, 27, 3546-3555.
- [194] J. A. McCubrey, N. M. Davis, S. L. Abrams, G. Montalto, M. Cervello, J. Basecke, M. Libra, F. Nicoletti, L. Cocco, A. M. Martelli, L. S. Steelman, *Advances in Biological Regulation* **2014**, 54, 176-196.
- [195] J. A. McCubrey, L. S. Steelman, F. E. Bertrand, N. M. Davis, M. Sokolosky, S. L. Abrams, G. Montalto, A. B. D'Assoro, M. Libra, F. Nicoletti, *Oncotarget* **2014**, 5, 2881.
- [196] J. Luo, *Cancer Letters* **2009**, 273, 194-200.
- [197] C. Pak, S. Miyamoto, *Cancer Discovery* **2013**, 3, 613-615.
- [198] M. Farago, I. Dominguez, E. Landesman-Bollag, X. Xu, A. Rosner, R. D. Cardiff, D. C. Seldin, *Cancer research* **2005**, 65, 5792-5801.
- [199] C. Ma, J. Wang, Y. Gao, T.-W. Gao, G. Chen, K. A. Bower, M. Odetallah, M. Ding, Z. Ke, J. Luo, *Cancer research* **2007**, 67, 7756-7764.
- [200] A. Pottegård, J. Hallas, B. L. Jensen, K. Madsen, S. Friis, *Journal of the American Society of Nephrology* **2015**.
- [201] A. Martinez, C. Gil, D. I. Perez, *International Journal of Alzheimer's Disease* **2011**, 2011.

- [202] R. Majeti, M. W. Becker, Q. Tian, T.-L. M. Lee, X. Yan, R. Liu, J.-H. Chiang, L. Hood, M. F. Clarke, I. L. Weissman, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 3396-3401.
- [203] T. Shimura, *Journal of radiation research* **2011**, *52*, 539-544.
- [204] V. Banerji, S. M. Frumm, K. N. Ross, L. S. Li, A. C. Schinzel, C. K. Hahn, R. M. Kakoza, K. T. Chow, L. Ross, G. Alexe, N. Tolliday, H. Inguilizian, I. Galinsky, R. M. Stone, D. J. DeAngelo, G. Roti, J. C. Aster, W. C. Hahn, A. L. Kung, K. Stegmaier, *The Journal of Clinical Investigation* **2012**, *122*, 935-947.
- [205] T. Neumann, L. Benajiba, S. Göring, K. Stegmaier, B. Schmidt, *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 8907-8919.
- [206] C. Hooper, R. Killick, S. Lovestone, *Journal of Neurochemistry* **2008**, *104*, 1433-1439.
- [207] D. E. Hurtado, L. Molina-Porcel, J. C. Carroll, C. MacDonald, A. K. Aboagye, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, *The Journal of Neuroscience* **2012**, *32*, 7392-7402.
- [208] J.-J. Pei, T. Tanaka, Y.-C. Tung, E. Braak, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **1997**, *56*, 70-78.
- [209] T. Ma, *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2014**, *39*, 707-710.
- [210] L. T. Alon, S. Pietrokovski, S. Barkan, L. Avrahami, O. Kaidanovich-Beilin, J. R. Woodgett, A. Barnea, H. Eldar-Finkelman, *FEBS Letters* **2011**, *585*, 1158-1162.
- [211] C.-H. Lin, Y.-S. Hsieh, Y.-R. Wu, C.-J. Hsu, H.-C. Chen, W.-H. Huang, K.-H. Chang, H. M. Hsieh-Li, M.-T. Su, Y.-C. Sun, G.-C. Lee, G.-J. Lee-Chen, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *89*, 11-19.
- [212] G. Luo, L. Chen, C. R. Burton, H. Xiao, P. Sivaprakasam, C. M. Krause, Y. Cao, N. Liu, J. Lippy, W. J. Clarke, *Journal of medicinal chemistry* **2016**, *59*, 1041-1051.
- [213] C. J. Phiel, C. A. Wilson, V. M. Y. Lee, P. S. Klein, *Nature* **2003**, *423*, 435-439.
- [214] C. J. Dunning, G. McGauran, K. Willén, G. K. Gouras, D. J. O'Connell, S. Linse, *ACS Chemical Neuroscience* **2016**, *7*, 161-170.
- [215] J. Verma, V. M. Khedkar, E. C. Coutinho, *Current Topics in Medicinal Chemistry (Sharjah, United Arab Emirates)* **2010**, *10*, 95-115.
- [216] R. E. Hubbard, *Structure-Based Drug Discovery: An Overview*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2006**.
- [217] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3-26.
- [218] T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest, A. Villalobos, *ACS Chemical Neuroscience* **2010**, *1*, 435-449.
- [219] D. I. Osolodkin, V. A. Palyulin, N. S. Zefirov, *Current pharmaceutical design* **2013**, *19*, 665-679.



- [220] P. Cohen, *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, 1, 309-315.
- [221] J. Jose, A. Gratz, U. Kucklaender, C. Goetz, (Jose, Joachim) DE102010025173A1, **2011**.
- [222] P. Cohen, *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, 3, 459-465.
- [223] M. Huse, J. Kuriyan, *Cell* **2002**, 109, 275-282.
- [224] F. Zuccotto, E. Ardini, E. Casale, M. Angiolini, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 53, 2681-2694.
- [225] M. P. Coghlan, A. A. Culbert, D. A. E. Cross, S. L. Corcoran, J. W. Yates, N. J. Pearce, O. L. Rausch, G. J. Murphy, P. S. Carter, L. Roxbee Cox, D. Mills, M. J. Brown, D. Haigh, R. W. Ward, D. G. Smith, K. J. Murray, A. D. Reith, J. C. Holder, *Chemistry & Biology* **2000**, 7, 793-803.
- [226] L. Feng, Y. Geisselbrecht, S. Blanck, A. Wilbuer, G. E. Atilla-Gokcumen, P. Filippakopoulos, K. Kräling, M. A. Celik, K. Harms, J. Maksimoska, R. Marmorstein, G. Frenking, S. Knapp, L.-O. Essen, E. Meggers, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, 5976-5986.
- [227] R. Bhat, Y. Xue, S. Berg, S. Hellberg, M. Ormö, Y. Nilsson, A.-C. Radesäter, E. Jerning, P.-O. Markgren, T. Borgegård, M. Nylöf, A. Giménez-Cassina, F. Hernández, J. J. Lucas, J. Díaz-Nido, J. Avila, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 45937-45945.
- [228] M. Kalinichev, L. A. Dawson, *International Journal of Neuropsychopharmacology* **2011**, 14, 1051-1067.
- [229] L. Meijer, A.-L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X. P. Ryan, C. A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani, C. Crovace, C. Tarricone, A. Musacchio, S. M. Roe, L. Pearl, P. Greengard, *Chemistry & Biology* **2003**, 10, 1255-1266.
- [230] M. Saitoh, J. Kunitomo, E. Kimura, H. Iwashita, Y. Uno, T. Onishi, N. Uchiyama, T. Kawamoto, T. Tanaka, C. D. Mol, D. R. Dougan, G. P. Textor, G. P. Snell, M. Takizawa, F. Itoh, M. Kori, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 6270-6286.
- [231] J. M. Nuss, S. D. Harrison, D. B. Ring, R. S. Boyce, S. P. Brown, D. Goff, K. Johnson, K. B. Pfister, S. Ramurthy, P. A. Renhowe, L. Seely, S. Subramanian, A. S. Wagman, X. A. Zhou, (Chiron Corporation, USA .) WO9965897A1, **1999**.
- [232] C. Schultz, A. Link, M. Leost, D. W. Zaharevitz, R. Gussio, E. A. Sausville, L. Meijer, C. Kunick, *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, 42, 2909-2919.
- [233] S. Berg, M. Bergh, S. Hellberg, K. Högdin, Y. Lo-Alfredsson, P. Söderman, S. von Berg, T. Weigelt, M. Ormö, Y. Xue, J. Tucker, J. Neelissen, E. Jerning, Y. Nilsson, R. Bhat, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 9107-9119.

- 
- [234] J. L. T. J. M. Berg, L. Streyer, *Streyer Biochemie*, Vol. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2010**.
- [235] A. Licht-Murava, B. Plotkin, M. Eisenstein, H. Eldar-Finkelman, *Journal of Molecular Biology* **2011**, 408, 366-378.
- [236] M. Hamann, D. Alonso, E. Martín-Aparicio, A. Fuertes, M. J. Pérez-Puerto, A. Castro, S. Morales, M. L. Navarro, M. del Monte-Millán, M. Medina, H. Pennaka, A. Balaiah, J. Peng, J. Cook, S. Wahyuono, A. Martínez, *Journal of Natural Products* **2007**, 70, 1397-1405.
- [237] D. I. Perez, V. Palomo, C. n. Pérez, C. Gil, P. D. Dans, F. J. Luque, S. Conde, A. Martínez, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54, 4042-4056.
- [238] D. I. Perez, S. Conde, C. Pérez, C. Gil, D. Simon, F. Wandosell, F. J. Moreno, J. L. Gelpí, F. J. Luque, A. Martínez, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, 6914-6925.
- [239] W. H. Fischer, J. Spiess, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, 84, 3628-3632.
- [240] S. Schilling, S. Manhart, T. Hoffmann, H.-H. Ludwig, C. Wasternack, H.-U. Demuth, *Biological chemistry* **2003**, 384, 1583-1592.
- [241] S. Schilling, T. Hoffmann, S. Manhart, M. Hoffmann, H.-U. Demuth, *FEBS letters* **2004**, 563, 191-196.
- [242] S. Schilling, C. Wasternack, H.-U. Demuth, in *Biological Chemistry*, Vol. 389, **2008**, p. 983.
- [243] M. Messer, *Nature* **1963**, 197, 1299.
- [244] T. Pohl, M. Zimmer, K. Mugele, J. Spiess, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, 88, 10059-10063.
- [245] S. Schilling, T. Hoffmann, M. Wermann, U. Heiser, C. Wasternack, H.-U. Demuth, *Analytical biochemistry* **2002**, 303, 49-56.
- [246] S. Zerhouni, A. Amrani, M. Nijs, N. Smolders, M. Azarkan, J. Vincentelli, Y. Looze, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1998**, 1387, 275-290.
- [247] T. Guevara, N. Mallorqui-Fernandez, R. Garcia-Castellanos, S. Garcia-Pique, G. Ebert Petersen, C. Lauritzen, J. Pedersen, J. Arnau, F. X. Gomis-Ruth, M. Sola, *The Journal of Biochemical Chemistry* **2006**, 387, 1479-1486.
- [248] K.-F. Huang, Y.-L. Liu, W.-J. Cheng, T.-P. Ko, A. H.-J. Wang, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 13117-13122.



- [249] M. Azarkan, B. Clantin, C. Bompard, H. Belrhali, D. Baeyens-Volant, Y. Looze, V. Villeret, R. Wintjens, *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **2005**, 61, 59-61.
- [250] R. Wintjens, H. Belrhali, B. Clantin, M. Azarkan, C. Bompard, D. Baeyens-Volant, Y. Looze, V. Villeret, *Journal of molecular biology* **2006**, 357, 457-470.
- [251] R. E. Booth, S. C. Lovell, S. A. Misquitta, R. C. Bateman, *BMC biology* **2004**, 2, 1.
- [252] K.-F. Huang, Y.-L. Liu, A. H.-J. Wang, *Protein expression and purification* **2005**, 43, 65-72.
- [253] S. Schilling, H. Cynis, A. von Bohlen, T. Hoffmann, M. Wermann, U. Heiser, M. Buchholz, K. Zunkel, H.-U. Demuth, *Biochemistry* **2005**, 44, 13415-13424.
- [254] S. Schilling, A. J. Niestroj, J.-U. Rahfeld, T. Hoffmann, M. Wermann, K. Zunkel, C. Wasternack, H.-U. Demuth, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 49773-49779.
- [255] T. M. Böckers, M. R. Kreutz, T. Pohl, *Journal of neuroendocrinology* **1995**, 7, 445-453.
- [256] D. Ramsbeck, M. Buchholz, B. Koch, L. Böhme, T. Hoffmann, H.-U. Demuth, U. Heiser, *Journal of medicinal chemistry* **2013**, 56, 6613-6625.
- [257] H. Cynis, J.-U. Rahfeld, A. Stephan, A. Kehlen, B. Koch, M. Wermann, H.-U. Demuth, S. Schilling, *Journal of molecular biology* **2008**, 379, 966-980.
- [258] H. J. GOREN, L. G. BAUCE, W. VALE, *Molecular pharmacology* **1977**, 13, 606-614.
- [259] R. E. Morty, P. Bulau, R. Pellé, S. Wilk, K. Abe, *Biochemical Journal* **2006**, 394, 635-645.
- [260] Y. Harigaya, T. C. Saido, C. B. Eckman, C.-M. Prada, M. Shoji, S. G. Younkin, *Biochemical and biophysical research communications* **2000**, 276, 422-427.
- [261] S. Jawhar, O. Wirths, T. A. Bayer, *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286, 38825-38832.
- [262] Y.-M. Kuo, M. R. Emmerling, A. S. Woods, R. J. Cotter, A. E. Roher, *Biochemical and biophysical research communications* **1997**, 237, 188-191.
- [263] N. Sergeant, S. Bombois, A. Ghestem, H. Drobecq, V. Kostanjevecki, C. Missiaen, A. Wattez, J. P. David, E. Vanmechelen, C. Sergheraert, *Journal of neurochemistry* **2003**, 85, 1581-1591.
- [264] M. Wulff, M. Baumann, A. Thümmeler, J. K. Yadav, L. Heinrich, U. Knüpfer, D. Schlenzig, A. Schierhorn, J.-U. Rahfeld, U. Horn, J. Balbach, H.-U. Demuth, M. Fändrich, *Angewandte Chemie* **2016**, 128, 5165-5168.
- [265] J. T. Huse, K. Liu, D. S. Pijak, D. Carlin, V. M.-Y. Lee, R. W. Doms, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 16278-16284.
- [266] J. Sevalle, A. Amoyel, P. Robert, M. C. Fournié-Zaluski, B. Roques, F. Checler, *Journal of neurochemistry* **2009**, 109, 248-256.

- [267] S. Schilling, T. Hoffmann, S. Manhart, M. Hoffmann, H.-U. Demuth, *FEBS Letters* **2004**, 563, 191-196.
- [268] J. M. Nussbaum, S. Schilling, H. Cynis, A. Silva, E. Swanson, T. Wangsanut, K. Tayler, B. Wiltgen, A. Hatami, R. Ronicke, K. Reymann, B. Hutter-Paier, A. Alexandru, W. Jagla, S. Graubner, C. G. Glabe, H.-U. Demuth, G. S. Bloom, *Nature* **2012**, 485, 651-655.
- [269] A. Alexandru, W. Jagla, S. Graubner, A. Becker, C. Bäuscher, S. Kohlmann, R. Sedlmeier, K. A. Raber, H. Cynis, R. Röncke, K. G. Reymann, E. Petrasch-Parwez, M. Hartlage-Rübsamen, A. Waniek, S. Rossner, S. Schilling, A. P. Osmand, H.-U. Demuth, S. von Hörsten, *The Journal of Neuroscience* **2011**, 31, 12790-12801.
- [270] S. Jawhar, O. Wirths, S. Schilling, S. Graubner, H.-U. Demuth, T. A. Bayer, *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286, 4454-4460.
- [271] S. Schilling, T. Appl, T. Hoffmann, H. Cynis, K. Schulz, W. Jagla, D. Friedrich, M. Wermann, M. Buchholz, U. Heiser, S. von Horsten, H. U. Demuth, *Journal of Neurochemistry* **2008**, 106, 1225-1236.
- [272] S. Schilling, U. Zeitschel, T. Hoffmann, U. Heiser, M. Francke, A. Kehlen, M. Holzer, B. Hutter-Paier, M. Prokesch, M. Windisch, W. Jagla, D. Schlenzig, C. Lindner, T. Rudolph, G. Reuter, H. Cynis, D. Montag, H.-U. Demuth, S. Rossner, *Nat Med* **2008**, 14, 1106-1111.
- [273] M. Biel, V. Wascholowski, A. Giannis, *Angewandte Chemie* **2004**, 116, 6574-6576.
- [274] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annual review of biochemistry* **1998**, 67, 425-479.
- [275] L. A. Passmore, D. Barford, *The Biochemical journal* **2004**, 379, 513-525.
- [276] A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *Chemistry & Biology* **2001**, 8, 739-758.
- [277] J. Adams, *Nature Reviews Cancer* **2004**, 4, 349-360.
- [278] L. Borissenko, M. Groll, *Chemical Reviews* **2007**, 107, 687-717.
- [279] C. Voss, Dissertation, Technische Universität Darmstadt (Darmstadt), **2014**.
- [280] J. R. Harris, *Biochimica et biophysica acta* **1968**, 150, 534-537.
- [281] M. Groll, W. Heinemeyer, S. Jäger, T. Ullrich, M. Bochtler, D. H. Wolf, R. Huber, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 96, 10976-10983.
- [282] M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, 386, 463-471.
- [283] I. Schechter, A. Berger, *Biochemical and biophysical research communications* **1967**, 27, 157-162.
- [284] W. Heinemeyer, M. Fischer, T. Krimmer, U. Stachon, D. H. Wolf, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 25200-25209.

- [285] A. K. Nussbaum, T. P. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanović, K. Dietz, W. Heinemeyer, M. Groll, D. H. Wolf, R. Huber, H.-G. Rammensee, H. Schild, *Proceeding of the National Academy of Science USA* **1998**, 95, 12504-12509.
- [286] P.-M. Kloetzel, F. Ossendorp, *Current Opinion in Immunology* **2004**, 16, 76-81.
- [287] B. Alberts, *Molecular Biology of the Cell: Reference Edition*, Garland Science, **2008**.
- [288] M. Matondo, M.-P. Bousquet-Dubouch, N. Gallay, S. Uttenweiler-Joseph, C. Recher, B. Payrastre, S. Manenti, B. Monsarrat, O. Burlet-Schiltz, *Leukemia Research* **2010**, 34, 498-506.
- [289] F. Lo Monte, T. Kramer, J. Gu, U. R. Anumala, L. Marinelli, V. La Pietra, E. Novellino, B. Franco, D. Demedts, F. Van Leuven, A. Fuertes, J. M. Dominguez, B. Plotkin, H. Eldar-Finkelman, B. Schmidt, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 4407-4424.
- [290] Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2014**.
- [291] P. Gerber, K. Müller, *Journal of computer-aided molecular design* **1995**, 9, 251-268.
- [292] R. Salomon-Ferrer, D. A. Case, R. C. Walker, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2013**, 3, 198-210.
- [293] G. Neudert, G. Klebe, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2011**, 51, 2731-2745.
- [294] ChemBioDrawUltra, Cambridge Soft, 940 Winter Street, Waltham, MA 02451 USA **2013**.
- [295] N. Miyaura, A. Suzuki, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1979**, 866-867.
- [296] N. Miyaura, K. Yamada, A. Suzuki, *Tetrahedron Letters* **1979**, 20, 3437-3440.
- [297] J. K. Choi, Y. S. Jeong, H. D. Kim, J. K. Kim, S. Y. Kim, K. W. Lee, U. T. Oh, H. G. Park, S. R. Park, Y. H. Park, (*Amorepacific Corporation*) WO2007120012 A1, **2007**.
- [298] H. C. I. I. James, I. M. McDonald, D. King, R. E. Olson, N. Wang, C. I. Iwuagwu, F. C. Zusi, J. E. Macor, (*Bristol-Myers Squibb Company*) US20100099684 A1, **2010**.
- [299] F.-N. Li, N.-J. Kim, D.-J. Chang, J. Jang, H. Jang, J.-W. Jung, K.-H. Min, Y.-S. Jeong, S.-Y. Kim, Y.-H. Park, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2009**, 17, 8149-8160.
- [300] K. Koguro, T. Oga, S. Mitsui, R. Orita, *Synthesis* **1998**, 1998, 910-914.
- [301] Z. P. Demko, K. B. Sharpless, *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 7945-7950.
- [302] B. Schmidt, D. Meid, D. Kieser, *Tetrahedron* **2007**, 63, 492-496.
- [303] Y. Wang, Y. Li, Y. Li, G. Zheng, Y. Li, (*Ratiopharm GmbH*) WO2006081807 A2, **2006**.
- [304] W. G. Finnegan, R. A. Henry, R. Lofquist, *Journal of the American Chemical Society* **1958**, 80, 3908-3911.
- [305] T. Fuchss, W. Mederski, F. Zenke, (*Merck Patent GmbH*) WO2012000632 A1, **2012**.

- [306] C. B. Baltus, N. J. Press, J. Spencer, *Synlett* **2012**, 23, 2477-2480.
- [307] D. J. Huggins, W. Sherman, B. Tidor, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 1424-1444.
- [308] Y. Kawasaki, E. Freire, *Drug discovery today* **2011**, 16, 985-990.
- [309] *Test Guideline 107*, OECD, Paris, **1981**.
- [310] R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers, J. M. Vela, R. Maldonado, M. Hamon, *In vivo Models for Drug Discovery*, Vol. 62, John Wiley & Sons, **2014**.
- [311] C. Nusslein-Volhard, R. Dahm, *Zebrafish*, Oxford University Press, **2002**.
- [312] K. Howe, M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, R. Koch, G.-J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L. T. Quintais, J. A. Guerra-Assuncao, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J.-H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S. F. Maguire, G. K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliott, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, B. Mortimer, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthravadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, et al., *Nature* **2013**, 496, 498-503.
- [313] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:de:PDF>, Zugriff: 02.03.2016
- [314] N. Nishiya, Y. Oku, Y. Kumagai, Y. Sato, E. Yamaguchi, A. Sasaki, M. Shoji, Y. Ohnishi, H. Okamoto, Y. Uehara, *Chemistry and Biology (Oxford, U. K.)* **2014**, 21, 530-540.
- [315] F. G. Hassan, N. A. Mohaimen, J. G. Al-Maliki, *International Journal of Advanced Research* **2014**, 2, 816822.
- [316] D. Paquet, R. Bhat, A. Sydow, E.-M. Mandelkow, S. Berg, S. Hellberg, J. Färling, M. Distel, R. W. Köster, B. Schmid, C. Haass, *Journal of Clinical Investigation* **2009**, 119, 1382-1395.
- [317] S. J. Collins, R. C. Gallo, R. E. Gallagher, *Nature* **1977**, 270, 347-349.
- [318] M. Lanotte, V. Martin-Thouvenin, S. Najman, P. Balerini, F. Valensi, R. Berger, *Blood* **1991**, 77, 1080-1086.

- [319] T. Kishimoto, *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens: Proceedings of the Sixth International Workshop and Conference Held in Kobe, Japan, 10-14 November 1996*, Garland Pub., **1998**.
- [320] A. Aderem, R. J. Ulevitch, *Nature* **2000**, 406, 782-787.
- [321] M. Buchholz, A. Hamann, S. Aust, W. Brandt, L. Böhme, T. Hoffmann, S. Schilling, H.-U. Demuth, U. Heiser, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 7069-7080.
- [322] M. Buchholz, U. Heiser, S. Schilling, A. J. Niestroj, K. Zunkel, H.-U. Demuth, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 664-677.
- [323] C.-H. Lee, H.-C. Huang, H.-F. Juan, *International journal of molecular sciences* **2011**, 12, 5304-5318.
- [324] A. K. Ghose, T. Herbertz, D. A. Pippin, J. M. Salvino, J. P. Mallamo, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51, 5149-5171.
- [325] P. Wu, T. E. Nielsen, M. H. Clausen, *Drug Discovery Today* **2016**, 21, 5-10.
- [326] P. Wu, T. E. Nielsen, M. H. Clausen, *Trends in Pharmacological Sciences* **2015**, 36, 422-439.
- [327] E. A. Harrington, D. Bebbington, J. Moore, R. K. Rasmussen, A. O. Ajose-Adeogun, T. Nakayama, J. A. Graham, C. Demur, T. Hercend, A. Diu-Hercend, M. Su, J. M. C. Golec, K. M. Miller, *Nature Medicine* **2004**, 10, 262-267.
- [328] J.-Y. Mérour, F. Buron, K. Plé, P. Bonnet, S. Routier, *Molecules* **2014**, 19, 19935-19979.
- [329] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4B8M>, Zugriff: 08.06.2016.
- [330] F. E. Kwarcinski, C. C. Fox, M. E. Steffey, M. B. Soellner, *ACS Chemical Biology* **2012**, 7, 1910-1917.
- [331] M. Wang, M. Gao, Q.-H. Zheng, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, 24, 4455-4459.
- [332] S. Von Niementowski, *Journal für Praktische Chemie* **1895**, 51, 564-572.
- [333] P. A. Harris, D. Bandyopadhyay, S. B. Berger, N. Campobasso, C. A. Capriotti, J. A. Cox, L. Dare, J. N. Finger, S. J. Hoffman, K. M. Kahler, R. Lehr, J. D. Lich, R. Nagilla, R. T. Nolte, M. T. Ouellette, C. S. Pao, M. C. Schaeffer, A. Smallwood, H. H. Sun, B. A. Swift, R. D. Totoritis, P. Ward, R. W. Marquis, J. Bertin, P. J. Gough, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 4, 1238-1243.
- [334] N. Munshi, S. Jeay, Y. Li, C. R. Chen, D. S. France, M. A. Ashwell, J. Hill, M. M. Moussa, D. S. Leggett, C. J. Li, *Molecular Cancer Therapeutics* **2010**, 9, 1544.
- [335] E. Gherardi, W. Birchmeier, C. Birchmeier, G. Vande Woude, *Nature Reviews Cancer* **2012**, 12, 89.

- [336] R. Katayama, A. Aoyama, T. Yamori, J. Qi, T. Oh-Hara, Y. Song, J. A. Engelman, N. Fujita, *Cancer Research* **2013**, 73, 3087.
- [337] A. Aoyama, R. Katayama, T. Oh-hara, S. Sato, Y. Okuno, N. Fujita, *Molecular cancer therapeutics* **2014**, 13, 2978-2990.
- [338] J. Bean, C. Brennan, J.-Y. Shih, G. Riely, A. Viale, L. Wang, D. Chitale, N. Motoi, J. Szoke, S. Broderick, M. Balak, W.-C. Chang, C.-J. Yu, A. Gazdar, H. Pass, V. Rusch, W. Gerald, S.-F. Huang, P.-C. Yang, V. Miller, M. Ladanyi, C.-H. Yang, W. Pao, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104, 20932-20937.
- [339] S. Eathiraj, R. Palma, E. Volckova, M. Hirschi, D. S. France, M. A. Ashwell, T. C. Chan, *The Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286, 20666.
- [340] S. Wilhelm, D. S. Chien, *Current pharmaceutical design* **2002**, 8, 2255-2257.
- [341] J. D. Moyer, E. G. Barbacci, K. K. Iwata, L. Arnold, B. Boman, A. Cunningham, C. DiOrio, J. Doty, M. J. Morin, M. P. Moyer, M. Neveu, V. A. Pollack, L. R. Pustilnik, M. M. Reynolds, D. Sloan, A. Theleman, P. Miller, *Cancer Research* **1997**, 57, 4838-4848.
- [342] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02029157>, Zugriff: 29.02.2016.
- [343] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01244191>, Zugriff: 29.02.2016.
- [344] L. L. Remsing Rix, B. M. Kuenzi, Y. Luo, E. Remily-Wood, F. Kinose, G. Wright, J. Li, J. M. Koomen, E. B. Haura, H. R. Lawrence, U. Rix, *ACS Chemical Biology* **2014**, 9, 353-358.
- [345] L. Shen, T. Adachi, D. Van den Bout, X. Y. Zhu, *Journal of American Chemical Society* **2012**, 134, 14172.
- [346] C. Basilico, S. Pennacchiotti, E. Vigna, C. Chiriaco, S. Arena, A. Bardelli, D. Valdembri, G. Serini, P. Michieli, *Clinical Cancer Research* **2013**, 19, 2381.
- [347] P. Michieli, F. Di Nicolantonio, *Nature Reviews Clinical Oncology* **2013**, 10, 372.
- [348] D. Bensinger, T. Neumann, C. Scholz, C. Voss, S. Knorr, U. Kuckelkorn, K. Hamacher, P.-M. Kloetzel, B. Schmidt, *ACS Chemical Biology* **2016**.
- [349] A. J. Disney, B. Kellam, L. V. Dekker, *ChemMedChem* **2016**, 11, 972-979.
- [350] P. R. Gerber, K. Muller, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1995**, 9, 251-268.
- [351] [http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche\\_ConExp\\_Test.asp?test=2842](http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche_ConExp_Test.asp?test=2842), Zugriff: 26.03.2013.
- [352] [http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche\\_ConExp\\_Test.asp?test=2879](http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche_ConExp_Test.asp?test=2879), Zugriff: 26.03.2013.
- [353] <http://per-form.hu/wp-content/uploads/2015/08/perkinelmer-TR-FRET-Technology.pdf>, Zugriff: 17.06.2016.

- 
- [354] <https://www.thermofisher.com/de/de/home/products-and-services/services/custom-services/screening-and-profiling-services/selectscreen-profiling-service/selectscreen-kinase-profiling-service.html>, Zugriff: 26.05.2016.
- [355] <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/DrugDiscoveryDevelopment/files/PDF-1-2015/20160204%20SSBK%20Customer%20Protocol%20and%20Assay%20Conditions.pdf>, Zugriff: 26.05.2016.
- [356] H.-J. Lee, Y.-S. Choi, K.-B. Lee, J. Park, C.-J. Yoon, *The Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106*, 7010-7017.
- [357] A. Bardelli, P. Longati, D. Gramaglia, C. Basilico, L. Tamagnone, S. Giordano, D. Ballinari, P. Michieli, P. M. Comoglio, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 14379-14383.
- [358] [http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche\\_CondExp\\_Test.asp?test=2867](http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche_CondExp_Test.asp?test=2867), Zugriff: 10.04.2016.
- [359] [https://www.entega.ag/fileadmin/downloads/vertrieb/trinkwasser\\_darmstadt.pdf](https://www.entega.ag/fileadmin/downloads/vertrieb/trinkwasser_darmstadt.pdf), Zugriff: 06.04.2016.



Abdruck mit freundlicher Genehmigung von ACS Publications [RightsLink® by Copyright Clearance Center].

## Evaluation of Improved Glycogen Synthase Kinase-3 $\alpha$ Inhibitors in Models of Acute Myeloid Leukemia

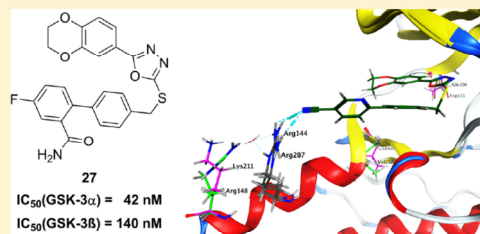
Theresa Neumann,<sup>†</sup> Lina Benajiba,<sup>‡</sup> Stefan Göring,<sup>†</sup> Kimberly Stegmaier,<sup>‡</sup> and Boris Schmidt<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Clemens Schöpf Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany

<sup>‡</sup>Department of Pediatric Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215, United States

### Supporting Information

**ABSTRACT:** The challenge for glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitor design lies in achieving high selectivity for one isoform over the other. The therapy of certain diseases, such as acute myeloid leukemia (AML), may require  $\alpha$ -isoform specific targeting. The scorpion shaped GSK-3 inhibitors developed by our group achieved the highest GSK-3 $\alpha$  selectivity reported so far but suffered from insufficient aqueous solubility. This work presents the solubility-driven optimization of our isoform-selective inhibitors using a scorpion shaped lead. Among 15 novel compounds, compound 27 showed high activity against GSK-3 $\alpha/\beta$  with the highest GSK-3 $\alpha$  selectivity reported to date. Compound 27 was profiled for bioavailability and toxicity in a zebrafish embryo phenotype assay. Selective GSK-3 $\alpha$  targeting in AML cell lines was achieved with compound 27, resulting in a strong differentiation phenotype and colony formation impairment, confirming the potential of GSK-3 $\alpha$  inhibition in AML therapy.



### ■ INTRODUCTION

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is a constitutively active, ubiquitous serine/threonine kinase that takes part in a number of physiological processes ranging from glycogen metabolism to apoptosis.<sup>1–3</sup> GSK-3 is a key mediator of various signaling pathways, such as the Wnt and the insulin/AKT signaling pathways.<sup>1</sup> Therefore, dysregulation of GSK-3 has been linked to various human diseases, such as cancer, diabetes, and neurodegenerative diseases.<sup>1,2,4–7</sup> Two related isoforms of GSK-3 exist in mammals, GSK-3 $\alpha$  and - $\beta$ , which share a sequence identity within their catalytic domains of 98%.<sup>2,3,8</sup> Beyond the catalytic domains they show significant differences.<sup>2,8</sup> Although these isoforms are structurally related, they are not functionally equivalent, and one cannot compensate for loss of the other.<sup>6</sup> The debate on the respective contributions of the isoforms GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  on the pathogenesis of different diseases is ongoing.<sup>9</sup> Various studies indicate that the therapies of certain diseases benefit from specific targeting of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ .<sup>6,10–14</sup> GSK-3 $\alpha$  was recently identified as a differentiation target in acute myeloid leukemia (AML).<sup>10</sup> AML is a hematopoietic malignancy defined by uncontrolled proliferation and disrupted myeloid differentiation.<sup>15,16</sup> AML is the second most common form of leukemia in adults.<sup>16</sup> The current treatment of AML with conventional chemotherapy is very aggressive yet ineffective for the majority of patients with the disease.<sup>15</sup> Thus, alternative targeted treatment approaches for AML are highly desirable.<sup>10,15</sup> GSK-3 $\alpha$  recently emerged as a potential target in this disease.<sup>10</sup>

Many molecular approaches for the inhibition of GSK-3 have been reported. However, most of these inhibitors lack selectivity for GSK-3 over other related kinases. This selectivity problem can challenge the clinical utility of these inhibitors leading to dose-limiting toxicities. Moreover, due to the structural similarity between the two ATP binding pockets of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ , most published inhibitors do not differ effectively between the GSK-3 isoforms. Therefore, our research focuses on the development of isoform-selective, ATP-competitive inhibitors using a scorpion shaped lead (Figure 1A).<sup>9</sup> Compound 1 (Figure 1) shows high kinase inhibitory activity and an impressive selectivity for GSK-3 $\alpha$ .<sup>9</sup> However, compound 1 could not be tested in vivo due to insufficient solubility. Therefore, it was chosen as lead structure for the design of improved GSK-3 inhibitors. Here we report the synthesis and optimization of scorpion shaped GSK-3 inhibitors with improved solubility. The most promising compounds were evaluated in a wild-type zebrafish embryo assay and in AML cell lines.

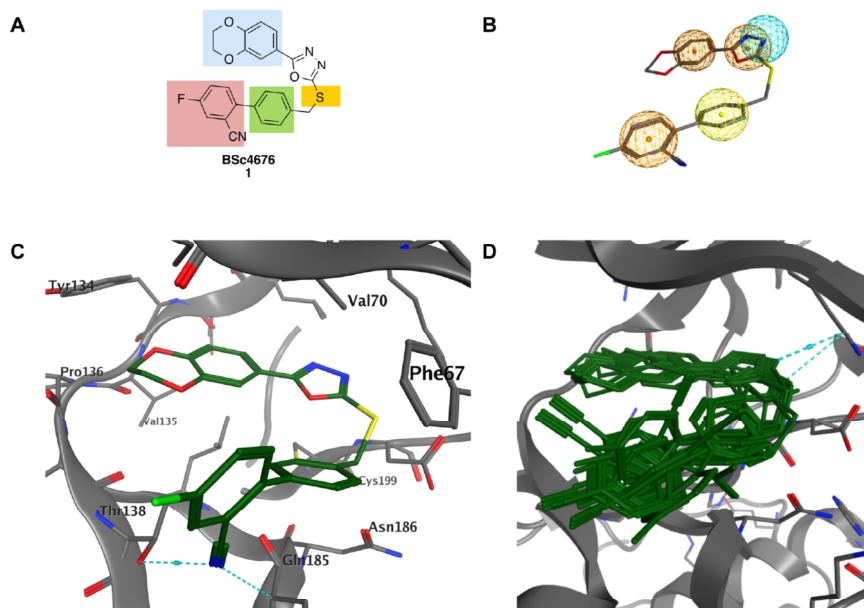
### ■ OPTIMIZATION STRATEGY

Optimization of compound 1 was performed to improve its pharmacokinetics and cell penetration. In addition, our intention was to increase the selectivity toward GSK-3 $\alpha$ . Unfortunately, the structure of GSK-3 $\alpha$  has not been solved.

Received: July 30, 2015

Published: October 23, 2015





**Figure 1.** (A) Compound **1** was used as lead structure for systematic modification. (B) Docking study of compound **1** using MOE 2014.09 and the known GSK-3 $\beta$  crystal structure (PDB code 3F88). (C) From the docking study in (B) resulting pharmacophore hypothesis is used for screening. The pharmacophore is represented by an H-bond acceptor (blue), aromatic rings (orange), and hydrophobic centroids (yellow). (D) Selection of compounds that match the docking model of **1**.<sup>17</sup>

Therefore, target-oriented synthesis of isoform-specific inhibitors can inform the mechanism behind  $\alpha$ -selectivity of our scorpion shaped GSK-3 inhibitors. All structures share the oxadiazole moiety, as it provides a high inhibitory activity and isoform selectivity.<sup>9</sup> Different substitution patterns at the biphenylic scaffold were explored in order to enhance GSK-3 $\alpha$  selectivity and to concurrently improve solubility.

We next designed 140 leadlike compounds by the systematic modification of scaffold elements: the heteroaromatic head group (Figure 1A, blue), the spacer between the oxadiazole and the biphenylic scaffold (Figure 1A, yellow), the first aromatic ring of the biphenylic scaffold (Figure 1A, green), and the terminal aromatic ring (Figure 1A, red). To find promising compounds all leadlike structures were evaluated by molecular docking. Initially, the essential ligand–receptor interactions of compound **1** with GSK-3 $\beta$  had to be determined to make it possible to compare the candidates with the lead structure and the respective docking hypothesis. Docking of compound **1** into the GSK-3 $\beta$  active site (PDB code 3F88) was done by the software MOE 2014.09.<sup>17</sup> Afterward the docking poses were rescored by the DSX rescoring function<sup>18</sup> with the aim to identify the best binding mode of compound **1** (Figure 1C). The resulting conformations agree with already published findings from our group.<sup>9</sup> The head group (dihydrobenzodioxine and oxadiazole) of compound **1** is oriented to the hinge region where it forms hydrophobic interactions with Tyr134. The oxadiazole ring is located between Val70 and Cys199. The biphenylic tail group establishes  $\pi$ – $\pi$ -stacking interaction with Phe67 and H– $\pi$  interactions with Gln185. In addition, the cyano moiety builds an H-bond to Thr138. From this model a

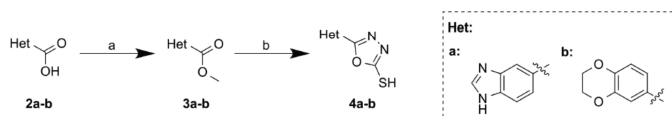
pharmacophore was generated. It consists of three aromatic features fulfilled by the oxadiazole ring and two phenyl rings (Figure 1B, orange), one hydrophobic centroid covered by one phenyl ring (Figure 1B, yellow), and one H-bond acceptor pharmacophore feature fulfilled by one nitrogen atom of the oxadiazole ring (Figure 1B, blue). With the intention to identify the best candidates of 140 leadlike compounds, docking was performed with pharmacophore placement. Then the resulted docking poses were again rescored by the DSX rescoring function.<sup>18</sup> Thereby the best rated docking poses reproduce the overall orientation of the lead structure compound **1** (Figure 1D).

On the basis of the results of the docking simulations, the best candidates were evaluated further. The next filtering was set by limitation of the ClogP value to be less than or equal to 4.5. This ensured that the number of hits were limited to more polar compounds than **1**. This filtering step reduced the number of hits to 94. The analysis of possible ways for derivatization and chemical accessibility led to 15 promising candidates, which were synthesized in the next steps as outlined below.

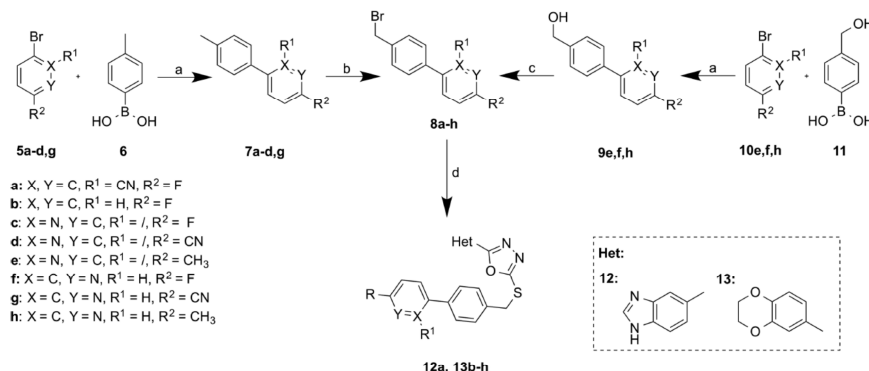
## CHEMISTRY

The reference compound **1** and some of the screening hits were synthesized according to the published procedure.<sup>9</sup> The building blocks of the head group and the tail group were prepared in a converging synthesis route.<sup>9</sup>

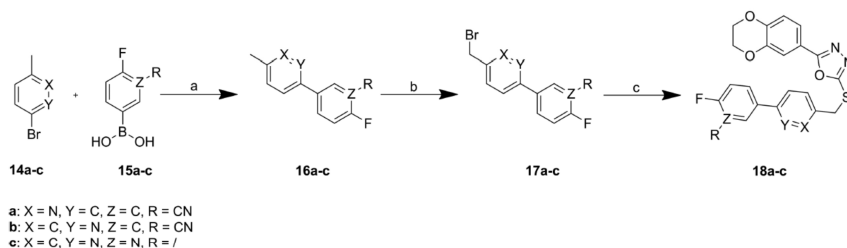
The synthesis of the head group building blocks **4a,b** was accomplished starting from the carboxylic acids **2a,b**. The carboxylic acids **2a,b** were esterified to the methyl esters **3a,b**.

Scheme 1<sup>4a</sup>

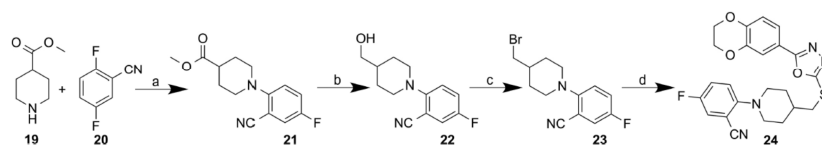
<sup>4a</sup>Reagents and conditions: (a) MeOH,  $\text{SOCl}_2$ , 0–50 °C, 96–99%; (b)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, reflux, then  $\text{CS}_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , EtOH, reflux, 11–45%.

Scheme 2<sup>4a</sup>

<sup>4a</sup>Reagents and conditions: (a)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 2 N aq  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , toluene/EtOH 1:1, 80 °C, 27–99%; (b) NBS, AIBN,  $\text{CCl}_4$ , reflux, 52–64%; (c)  $\text{PBr}_3$ , toluene, reflux; (d) **4a,b**, 4 N aq NaOH, DMF, rt, 12–66%.

Scheme 3<sup>4a</sup>

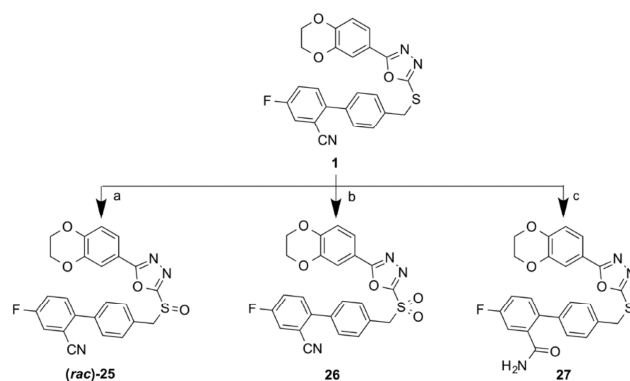
<sup>4a</sup>Reagents and conditions: (a)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 2 N aq  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , toluene/EtOH 1:1, 80 °C, 87–99%; (b) NBS, AIBN,  $\text{CCl}_4$ , reflux, 22–45%; (c) **4b**, 4 N aq NaOH, DMF, rt, 31–37%.

Scheme 4<sup>4a</sup>

<sup>4a</sup>Reagents and conditions: (a)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , DMSO, 100 °C, 42%; (b)  $\text{LiBH}_4$ , THF, reflux, 98%; (c)  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{PPh}_3$ , acetonitrile, rt, 35%; (d) **4b**,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, 80 °C, 71%.

The oxadiazole derivatives **4a,b** resulted from **3a,b** after reaction with hydrazine monohydrate followed by cyclization of the resulting hydrazides with carbondisulfide under basic conditions (Scheme 1).<sup>9</sup>

The synthesis of the biphenyl scaffold starts with a Suzuki coupling of the commercially available boronic acid **6** with various bromides **5a–d,g** or (hydroxyl)boronic acid **11** with bromines **10e,f,h** (Scheme 2). For the cases of intermediates

Scheme 5<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) *m*CPBA, DCM, 0° C to rt, 79%; (b) *m*CPBA, DCM, 0–30 °C, 68%; (c) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, TFA, reflux, 78%.

Table 1. Inhibitory Activity against GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ 

Compound	Het	Y	ClogP <sup>a</sup>	tPSA <sup>a</sup>	1 $\mu$ M of compound	
					GSK-3 $\alpha$ Inhibition [%] <sup>b</sup>	GSK-3 $\beta$ Inhibition [%] <sup>b</sup>
1		S	4.60	76.2	80	45
12a		S	3.98	82.1	36	0
( <i>rac</i> )-25		SO	3.40	93.3	48	42
26		SO <sub>2</sub>	3.11	110.3	0 (100 nM)	0 (100 nM)

<sup>a</sup>Calculated by ChemBioDraw Ultra (version 13.0.2).<sup>21</sup> <sup>b</sup>The results are expressed as a percent of control specific activity = 100 – ((measured specific activity/control specific activity)  $\times$  100), at a concentration of 1  $\mu$ M test compound (100 nM for 26). The measurements were performed in duplicate.

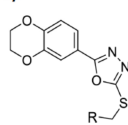
7a–d,g a radical bromination with NBS and AIBN was performed to obtain bromides 8a–d,g. The resulting benzylic alcohols 9e,f,h, however, were treated with phosphorus tribromide, to convert them into the benzylic bromides 8e,f,h (Scheme 2). Coupling of the biphenylic bromides 8a–h to the mercaptans 4a,b gave the final compounds 12a, 13b–h.

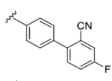
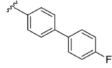
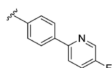
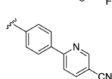
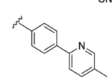
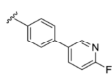
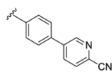
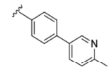
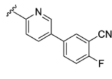
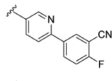
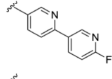
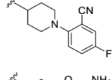
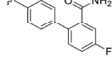
Suzuki coupling of the fluoroboronic acids 15a–c with bromines 14a–c followed by radical bromination gave the benzylic bromides 17a–c, which were coupled under basic conditions to the mercaptan 4b to yield the final compounds 18a–c (Scheme 3).

The ortho-substituted product 21 was obtained by a nucleophilic aromatic substitution of 2,5-difluorobenzonitrile (20) and methylpiperidine-4-carboxylate (19) with cesium

carbonate (Scheme 4). The reduction of the methoxy ester 21 by lithium borohydride provided the primary alcohol 22. Appel reaction of 22 gave the bromide 23, which was coupled under basic conditions to the mercaptan 4b to yield the final compound 24.

The sulfur atom of the previously synthesized compound 1 was oxidized by *m*CPBA to the final compounds (*rac*)-25 and 26 (Scheme 5). The final compound 27 was obtained by the partial hydrolysis of the cyano group of 1 under acidic conditions (Scheme 5).

Table 2. Inhibitory Activity against GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ 


Compound	R	ClogP <sup>a</sup>	tPSA <sup>a</sup>	GSK-3 $\alpha$ Inhibition [%] <sup>b</sup>	GSK-3 $\beta$ Inhibition [%] <sup>b</sup>
				1 $\mu$ M of compound	
1		4.60	76.2	80	45
13b		5.17	52.4	13	6
13c		3.97	64.8	86	84
13d		3.37	88.6	86	44
13e		4.24	64.8	86	88
13f		3.76	64.8	95	78
13g		3.36	88.6	58	21
13h		4.03	64.8	99	89
18a		3.15	88.6	21	0
18b		3.36	88.6	49	28
18c		2.55	77.1	93	75
24		3.88	79.4	20	10
27		3.39	95.5	100	97

<sup>a</sup>Calculated by ChemBioDraw Ultra (version 13.0.2).<sup>21</sup> <sup>b</sup>The results are expressed as a percent of control specific activity = 100 - ((measured specific activity/control specific activity)  $\times$  100), at a concentration of 1  $\mu$ M test compound. The measurements were performed in duplicate.



## IN VITRO PHARMACOLOGY AND STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIP

The obtained compounds were tested for their inhibitory activity against GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in a commercial in vitro assay.<sup>19,20</sup> The assay was performed at an inhibitor concentration of 1  $\mu$ M (100 nM for **26**), using isolated GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  from porcine brain and staurosporine as control.<sup>19,20</sup> The results are expressed as percentage of control specific activity.<sup>19,20</sup> The structure–activity relationship was analyzed by systematic modification of scaffold moieties.

Initially, the hinge binding dihydrobenzodioxine moiety of the lead structure **1** was replaced by a benzimidazole group as potential hinge binder. This led to a massive decreased inhibitory activity against both isoforms as compared to the lead structure **1** (Table 1). Consequently, the benzimidazole scaffold was abandoned. For all further modification steps the dihydrobenzodioxine scaffold was unmodified.

In the next step, the impact of the spacer between the oxadiazole and the biphenylic scaffold was investigated. The oxidation of the thioether **1** to the racemic sulfoxide (*rac*)-**25** resulted in a decrease of inhibitory activity, especially against GSK-3 $\alpha$  (Table 1). Due to the heavy loss of isoform selectivity, the racemic product was not separated into the pure enantiomers, as neither of the enantiomeric sulfoxides is as active as the sulfide. The further oxidation of **1** to the sulfone **26** led to an even stronger decrease of inhibitory activity (Table 1). The introduction of oxygen atoms on the linking sulfur apparently results in repulsive interactions, presumably as the biphenylic scaffold is displaced and the important  $\pi$ -stacking interaction with Phe67 or with Gln185 cannot be formed.

The influence of the biphenylic scaffold was investigated next keeping the hinge binding moiety and the spacer constant. The introduction of a nonaromatic piperidine in **24** resulted in an immense drop of inhibitory potency (Table 2) because the  $\pi$ -stacking interaction with Phe67 or with Gln185 can no longer be formed.

The impact of the cyano substituent on the activity and  $\alpha$ -selectivity of **1** was addressed next (Table 2). The complete removal of the cyano substituent in **13b** (Table 2) resulted in a substantial loss of inhibitory activity.

However, the exchange of the cyano substituent for the amide substituent in compound **27** resulted in the most potent compound (Table 2). Compound **27** inhibits GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  at a concentration of 1  $\mu$ M at 100%. The substitution by 3-fluoropyridine in **13c** and 2-fluoropyridine in **13f** led to an improved inhibitory potency against GSK-3 $\beta$  (Table 2). The inhibitory potency against GSK-3 $\alpha$  increased slightly. However, the increase of the inhibitory potency against the  $\alpha$ -isoform is stronger for **13f** than for **13c**. Consequently, the pyridine in **13f** was changed back to a phenyl with a cyano substituent in ortho position to the fluorine. Due to the chemical accessibility, the first phenyl ring of the biphenylic scaffold had to be changed simultaneously to a 2-pyridine in **18b** and a 3-pyridine in **18a**. In both cases the modifications led to an immense drop of inhibitory potency (Table 2). Moreover, a total loss of activity against GSK-3 $\beta$  was observed for **18a**. We assumed that the ortho-cyano substituent in **18b** and **18a** was responsible for the sharp drop of activity. This hypothesis was confirmed by the introduction of a second 2-pyridine (**18c**) into **13f**, where **18c** shows the same activity like **13f** (Table 2). In the last step the impact of the fluoro substituent within the pyridines of **13f** and **13c** on the activity and  $\alpha$ -selectivity was explored. The

introduction of electron-donating methyl substituents in **13e** and **13h** leads to a slight improvement of inhibitory potency against GSK-3 $\beta$  (Table 2). However, the inhibitory potency against GSK-3 $\alpha$  was not affected. Consequently, the differentiation between the isoforms was reduced. The introduction of an electron-withdrawing cyano substituent in **13d** and **13g** led to a decrease of inhibitory potency against GSK-3 $\alpha$  (Table 2). However, both compounds showed the best discrimination between the isoforms with  $\alpha$ -selectivity toward GSK-3 $\alpha$ . In the case of the inhibition of the  $\beta$ -isoform both compounds behave differently. **13d** showed the same inhibitory activity against GSK-3 $\beta$  as **1**. However, in the case of **13g** a striking decrease of inhibitory activity was observed against the GSK-3 $\beta$ . The docking of **13d** and **13g** into the GSK-3 $\beta$  active site suggested that both cyano substituents contribute to the inhibitor activity by establishing a H-bond to the amino acid Arg144. The different activities between both compounds can be explained by the rotation of the biphenylic residue. The biphenylic residue of **13g** is rotated by about 60° compared to **13d**. Consequently, **13g** cannot form a  $\pi$ -stacking interaction with Gln185. Due to the  $\pi$ -stacking interaction with Gln185, **13d** interacts better with the active site. Accordingly, **13d** shows a higher activity against GSK-3 $\beta$  than **13g**.

The IC<sub>50</sub> values of the lead compound **1** and the most potent compound **27** were determined for detailed analysis (Table 3).

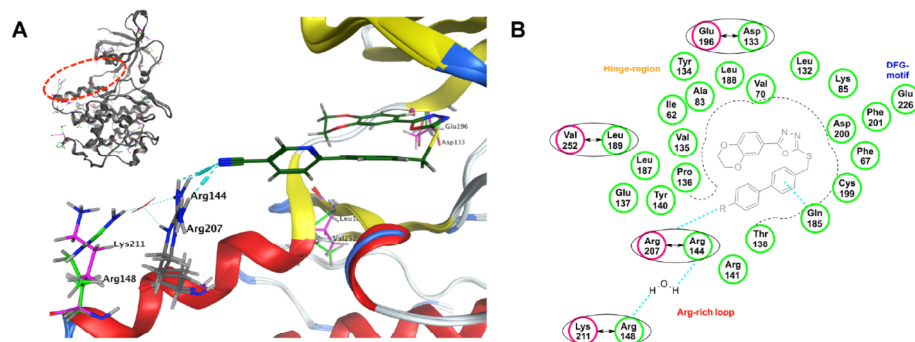
**Table 3.** Inhibitory Activity against GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ , IC<sub>50</sub> [ $\mu$ M]

compd	IC <sub>50</sub> , GSK-3 $\alpha$ [nM] <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> , GSK-3 $\beta$ [nM] <sup>a</sup>
<b>1</b>	230	>1000
<b>27</b>	42	140

<sup>a</sup>The evaluation of the activity in GSK-3 $\alpha$  (h)<sup>19</sup> and GSK-3 $\beta$  (h)<sup>20</sup> was performed by the company Cerep using a published procedure by Greengard et al. (Supporting Information).<sup>22</sup> The IC<sub>50</sub> values were determined by measurement of eight concentrations (0.03, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 1000 nM).

With our novel inhibitor **27** the activity and selectivity against GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  could be increased further. With an IC<sub>50</sub> value of 42 nM for GSK-3 $\alpha$  and 140 nM for GSK-3 $\beta$ , compound **27** inhibits GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  stronger than the lead compound **1**.

With the intention to elucidate the difference between both isoforms of GSK-3 a sequence alignment of GSK-3 $\alpha$  (UniProtKB, P49840) on the 3D-structure of GSK-3 $\beta$  (PDB, 3F88) was performed. The sequence identity between GSK-3 $\beta$  and GSK-3 $\alpha$  was calculated to be 86% by MOE 2014.09.<sup>17</sup> However, all differences between the two isoforms are located away from the ATP-binding site. This results in a similarity of 98% within the active site. The SAR study of **13d** is best suited to illustrate the reasons for isoform selectivity (Figure 2A). It shows that the cyano substituent contributes to the inhibitor selectivity by establishing an H-bond to the amino acid Arg144 (GSK-3 $\beta$ ) and within the  $\alpha$ -isoform to Arg207 (GSK-3 $\alpha$ ). Arg144 and Arg207 are located in the Arg-rich loop. However, the neighboring amino acids within the Arg-rich loop differ between the isoforms. Within GSK-3 $\beta$  there is Arg148 (green), while within GSK-3 $\alpha$  there is Lys211 (pink). Within GSK-3 $\beta$  Arg144 interacts with the next located amino acid Arg148 over a coordinated water molecule (Figure 2A). However, within GSK-3 $\alpha$  the adjacent amino acids, Arg207 and Lys211, do not interact with each other (Figure 2A). We suggest that the water-mediated H-bond between Arg144 and Arg148 is



**Figure 2.** (A) Docking study of compound **13d** using MOE 2014.09 and the aligned structure of GSK-3 $\alpha$  (UniProtKB code P49840) and GSK-3 $\beta$  (PDB code 3F88).<sup>17</sup> Differing amino acids are highlighted, GSK-3 $\beta$  (green) and (GSK-3 $\alpha$ ) pink. (B) Schematic overview of the selectivity hypothesis of our scorpion shaped GSK-3 inhibitors.

responsible for the isoform selectivity of **13d**. The amino acids within the Arg-rich loop are likely solvent exposed and quite flexible. But the water-mediated H-bond between Arg144 and Arg148 may restrict the motion of the side chains, which would cause a conformational entropic penalty.<sup>23</sup> This could cancel out any gain in binding energy from the interaction between ligand and protein.<sup>23</sup> Consequently, **13d** inhibits GSK-3 $\beta$  less potently than GSK-3 $\alpha$  (Table 2). We therefore propose that the isoform selectivity of our scorpion shaped GSK-3 inhibitors is caused by the two different amino acids, GSK-3 $\beta$ , Arg148 (green), and GSK-3 $\alpha$ , Lys211 (pink), within the Arg-rich loop. Consequently, the para-substituent of the biphenylic moiety of our scorpion shaped GSK-3 inhibitors plays a key role in the selectivity of the inhibitor (Figure 2B). Obviously, this is a speculative hypothesis, which has to be confirmed by more advanced theoretical and experimental work as well as X-ray studies of GSK-3 $\alpha$ .

#### ■ AQUEOUS SOLUBILITY OF SELECTED COMPOUNDS

The aqueous solubility of chemical agents affects the uptake of the substances into cells and their oral bioavailability. Consequently, a good water solubility is essential for sufficient bioavailability, which must be considered for the performance of the compound within the organism. Solubility-driven optimization of **1** was the main intention of this work. The solubility values of the most active compounds **1**, **13c**–**h**, **18c**, and **27** are shown in Table 4. Some of the compounds (**1**, **13e**, **13h**, **18c**) showed a poor water solubility of below 1  $\mu\text{g/mL}$ , which makes them unsuitable for further development. **13d** and **27** are not only the most potent compounds but also the most soluble. The highest water solubility of 78  $\mu\text{g/mL}$  (181  $\mu\text{M}$ ) was observed for **13d**. The most potent compound **27** also has good aqueous solubility of 34  $\mu\text{g/mL}$  (73  $\mu\text{M}$ ).

#### ■ IN VIVO EVALUATION

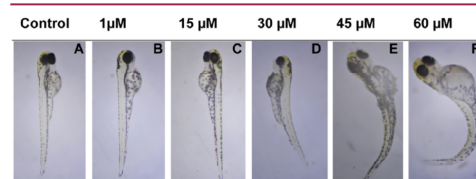
The most soluble and most active candidates **13d** and **27** were further profiled for in vivo activity in wild-type zebrafish (*Danio rerio*) embryos. The zebrafish embryo is a useful model to assess dose-dependent bioavailability and toxicity of compounds. The embryos were collected and maintained in E3 medium at  $\sim 26^\circ\text{C}$ . The compounds were added 24 h

**Table 4.** Aqueous Solubility of Selected Compounds

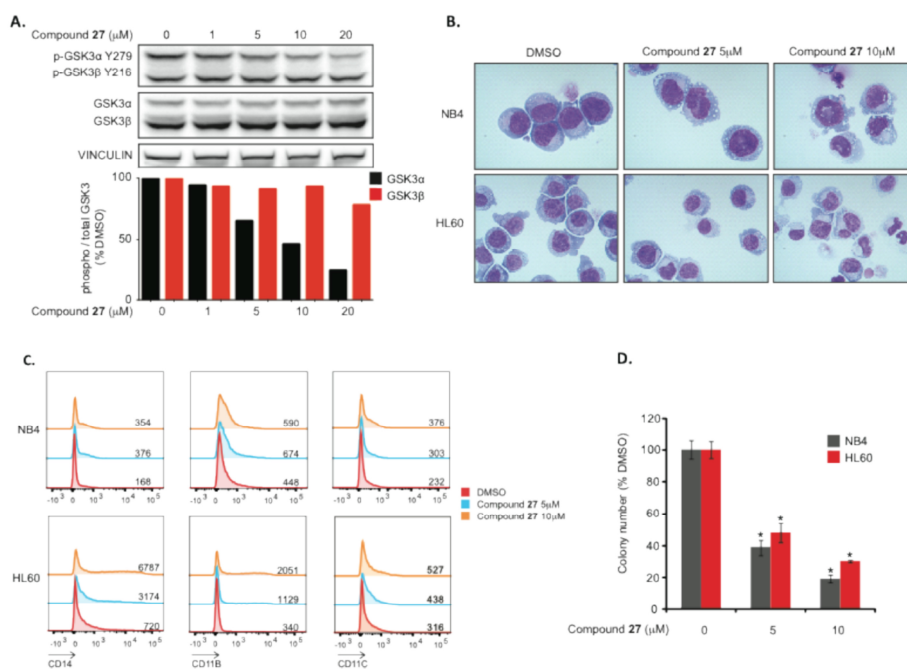
compd	solubility [ $\mu\text{g/mL}$ ] <sup>a</sup>	solubility [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a</sup>
<b>1</b>	<1	1
<b>13c</b>	dec	dec
<b>13d</b>	78	181
<b>13e</b>	<1	1
<b>13f</b>	7	17
<b>13g</b>	21	50
<b>13h</b>	<1	<1
<b>18c</b>	<1	1
<b>27</b>	34	73

<sup>a</sup>Related to the in vivo assay conditions all diluted samples contain water and 2% DMSO. The determination was done by the "shake-flask" method<sup>24</sup> and HPLC measurements.

postfertilization (hpf) and the phenotypes compared at 96 and 120 hpf. Both compounds showed no lethality in our concentration range ( $<60 \mu\text{M}$ ). Compound **13d** showed no effects on the wild-type zebrafish embryos. At lower concentrations of compound **27** from 1 to 15  $\mu\text{M}$  no abnormalities were observed (Figure 3). At concentrations of **27** higher than 30  $\mu\text{M}$  all zebrafish embryos showed a stunted and crooked tailed phenotype (Figure 3). These observations support the absorption and cell penetration of compound **27**. Furthermore, this zebrafish embryo assay demonstrates that compound **27** disturbs the zebrafish development. For



**Figure 3.** In vivo effects on wt zebrafish embryos by compound **27** (A–F). Compound **27** was added 24 h postfertilization (hpf) to five embryos in duplicates, and the phenotypes were compared after 96 hpf. (A) Control embryo in 2% DMSO. Zebrafish embryos were treated with compound **27** at increasing concentrations of (B) 1  $\mu\text{M}$ , (C) 15  $\mu\text{M}$ , (D) 30  $\mu\text{M}$ , (E) 45  $\mu\text{M}$ , (F) 60  $\mu\text{M}$ .



**Figure 4.** In vitro effects of compound 27 in AML cell lines (HL-60 and NB4). Selective GSK-3 $\alpha$  inhibition after a 24 h treatment with increasing concentrations of compound 27 in NB4. Histograms show a quantification of p-GSK-3 $\alpha$  Tyr279 and p-GSK-3 $\beta$  Tyr216 relative to total GSK-3 $\alpha$  and - $\beta$ , respectively (A). Morphological changes (B, decreased nuclear to cytoplasmic ratio and increased vacuolization) and surface markers expression (CD11b, CD11c, and CD14) are consistent with differentiation after 6 days of treatment. Histograms and mean fluorescence of 10 000 independent events are represented (C). Concentration-dependent colony formation impairment: (\*)  $p < 0.05$  relative to corresponding DMSO. Error bars represent the mean  $\pm$  SEM (D).

embryonic development of the zebrafish the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway plays an important role.<sup>25</sup> The Wnt signaling pathway involves the complex interplay of multiple proteins, including GSK-3 $\beta$  in this signaling network.<sup>26</sup> The observed phenotype is consistent with activation of  $\beta$ -catenin, which is associated with inhibition of GSK-3 $\beta$ .<sup>25,27</sup> Compound 27 exhibits IC<sub>50</sub> values of 42 nM for GSK-3 $\alpha$  and 14 nM for GSK-3 $\beta$  inhibition. The concentrations in this experiment are too high to achieve isoform selectivity. Consequently, compound 27 is no longer selective to GSK-3 $\alpha$  at concentrations higher than 30  $\mu$ M. It is likely that with this gross experiment isoform selectivity cannot be detected. Therefore, we tested compound 27 in a cell assay at lower concentrations to investigate the effects on GSK-3 $\alpha$  versus GSK-3 $\beta$ .

#### IN VITRO EFFECTS IN AML CELL LINES

To further investigate the activity of compound 27 in a disease-based model in vitro, we treated two AML cell lines (HL-60 and NB4) with increasing concentrations of compound 27. Compound 27 shows a specific on-target effect with a concentration-dependent decrease in Tyr279 GSK-3 $\alpha$  phosphorylation without any relevant effect on Tyr216 GSK-3 $\beta$  phosphorylation up to 20  $\mu$ M (Figure 4A). GSK-3 $\alpha$  inhibition with compound 27 induces morphological (Figure 4B) and surface marker changes (Figure 4C) consistent with AML

differentiation. Selective GSK-3 $\alpha$  inhibition results in methylcellulose colony formation impairment (Figure 4D) in NB4 and HL-60 cell lines.

#### CONCLUSION

Starting from the poorly soluble lead compound 1, a series of improved GSK-3 inhibitors was obtained by rational design. Optimization, primarily of the biphenylic scaffold of 1, led to the potent and  $\alpha$ -selective GSK-3 inhibitor 27 with improved solubility. Compound 27 exhibits IC<sub>50</sub> values of 42 nM for GSK-3 $\alpha$  and 140 nM for GSK-3 $\beta$ . The homology model of GSK-3 $\alpha/\beta$  and the in vitro activities of the isoform-selective compounds led us to the hypothesis that interactions to Arg148 (GSK-3 $\beta$ ) and Lys211 (GSK-3 $\alpha$ ) within the Arg-rich loop are significant contributors for isoform selectivity.

Our best compounds 13d and 27 were further profiled for efficacy and toxicity in the wt zebrafish embryo assay. Compound 27 showed reported phenotypes without lethality in vivo and proof of efficacy in vitro in two AML cell lines. A strong dose dependent differentiation phenotype and colony formation impairment through selective GSK-3 $\alpha$  inhibition was observed in AML cell lines. The properties of 27 make it an excellent tool compound to study the different pathogenesis contributions of the isoforms GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  and a promising therapeutic candidate in AML.



## ■ EXPERIMENTAL SECTION

**General Information.** All chemicals were purchased as reagent grade from commercial suppliers and used without further purification. All reactions under anhydrous conditions were carried out under argon atmosphere with dry solvents.

The  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 300 spectrometer at 300 MHz and on a Bruker DRX 500 spectrometer at 500 MHz. The  $^{13}\text{C}$  spectra were recorded on a Bruker DRX 300 spectrometer at 75 MHz and on a Bruker DRX 500 spectrometer at 125 MHz. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) and calibrated from the used solvent:  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta_{\text{CDCl}_3}$  = 7.26 ppm,  $\delta_{\text{CDCl}_3}$  = 77.16 ppm),  $\text{DMSO}-d_6$  ( $\delta_{(\text{CHD}_3)\text{SO}(\text{CD}_3)}$  = 2.50 ppm,  $\delta_{(\text{CD}_3)\text{SO}(\text{CD}_3)}$  = 39.52 ppm). The respective measuring frequency, the used solvent, and the measuring temperature are added in parentheses to the spectroscopic data. Fine structures of proton signals are labeled with the following abbreviations: s for singlet, d for doublet, t for triplet, q for quartet, and m for multiplet. Coupling constants ( $J$  values) are given in hertz (Hz).

Mass spectrometry was performed on a MAT 95 double focusing sector field EI-MS. Detected ion masses ( $m/z$ ) are expressed in u.

Analytical high performance liquid chromatographies (HPLC) were carried out on an Agilent 1100 (column, reversed phase, Synergi 4u Polar-RP 80A, 4.6 mm  $\times$  150 mm, variable wavelength detector  $\lambda$  = 254 nm). As a standard method a solvent gradient of acetonitrile (B) and 0.1% trifluoroacetic acid in water (A) (70% A; 30% B (0 to 1 min) up to 90% B) with a flow rate of 1 mL/min and an elapsed time of 12 min was used.

Flash column chromatography was carried out using silica gel 60 (15–40  $\mu\text{m}$ , Merck). The automated flash chromatography was carried out on a Combi Flash R<sub>f</sub> from Teledyne Isco using a reversed phase C18 high performance column (RediSep) and a mixture of  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ . Thin-layer chromatography was carried out using aluminum sheets precoated with silica gel 60 F254 (0.2 mm, Merck). UV light with a wavelength of 254 and 360 nm was used for detection.

All compounds that were evaluated in biological assays had >95% purity using HPLC method described above.

**Methyl 1*H*-Benzo[d]imidazole-5-carboxylate (3a).** 3a was synthesized in a similar manner to that described for 4b in the literature procedure by Schmidt et al.<sup>9</sup> HPLC: 83%,  $t_R$  = 0.83 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 3.87 (s, 3H), 7.68 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.84 (dd,  $J$  = 1.4 Hz,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.40 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 51.9, 112.1, 123.0, 123.3, 125.7, 137.9, 142.1, 144.6, 166.8.

**Methyl 2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxine-6-carboxylate (3b).** 3b was synthesized according to the literature procedure by Schmidt et al.<sup>9</sup>

**5-(1*H*-Benzo[d]imidazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazole-2-thiol (4a).** 4a was synthesized in a similar manner to that described for 4b in the literature procedure by Schmidt et al.<sup>9</sup> HPLC: 90%,  $t_R$  = 0.92 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 7.75 (dd,  $J$  = 1.6 Hz,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.79 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 8.10 (d,  $J$  = 0.8 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 113.9, 116.2, 120.1, 123.2, 123.7, 137.9, 140.0, 144.5, 163.3, 177.3.

**5-(2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazole-2-thiol (4b).** 4b was synthesized according to the literature procedure by Schmidt et al.<sup>9</sup>

**General Procedure A: Suzuki Coupling Reaction (7a–d,g; 9e,f,h; 16a–c).**<sup>9</sup> Under an argon atmosphere the aryl bromide (2.50 mmol, 1.00 equiv) was dissolved in 7 mL of toluene/EtOH (1/1). To the solution  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.07 mmol, 0.03 equiv) and 3.75 mL of 2 N aqueous  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  were added, and the two-phase system was stirred for 15 min. Then the boronic acid (3.00 mmol, 1.20 equiv) was added, and the reaction mixture was refluxed at 80  $^\circ\text{C}$  for 2 d. After confirmation of the completion of the reaction by HPLC, the mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product was purified by column chromatography using a mixture of cyclohexane/EtOAc.

**4-Fluoro-4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-carbonitrile (7a).** 7a was synthesized according to the literature procedure by Schmidt et al.<sup>9</sup>

**4-Fluoro-4'-methyl-1,1'-biphenyl (7b).** Yield 99%, colorless solid. HPLC: 97%,  $t_R$  = 8.12 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.34 (s, 3H), 7.26 (m, 4H), 7.53 (d,  $J$  = 8.07 Hz, 2H), 7.66 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 20.6, 115.6 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 19 Hz, 2C), 126.4 (2C), 128.3 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 8 Hz, 2C), 129.5 (2C), 136.2, 136.5 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 3 Hz), 136.6, 161.6, (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 242 Hz).

**5-Fluoro-2-(*p*-tolyl)pyridine (7c).** Yield 67%, beige solid. HPLC: 98%,  $t_R$  = 6.17 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.35 (s, 3H), 7.29 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 7.78 (td,  $J$  = 8.8 Hz,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.99 (dd,  $J$  = 8.9 Hz,  $J$  = 4.4 Hz, 1H), 8.62 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 20.7, 121.2 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 4 Hz), 124.0 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 18 Hz), 126.3 (2C), 129.3 (2C), 135.0, 137.2 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 24 Hz), 138.4, 152.7 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 3 Hz), 158.4 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 254 Hz).

**6-(*p*-Tolyl)nicotinonitrile (7d).** Yield 85%, beige solid. HPLC: 96%,  $t_R$  = 6.77 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.38 (s, 3H), 7.35 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 8.08 (m, 2H), 8.16 (dd,  $J$  = 8.4 Hz,  $J$  = 0.8 Hz, 1H), 8.34 (dd,  $J$  = 8.4 Hz,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 9.06 (dd,  $J$  = 2.2 Hz,  $J$  = 0.8 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 20.9, 107.0, 117.3, 119.7, 127.1 (2C), 129.6 (2C), 134.2, 140.5, 140.8, 152.4, 159.1.

**5-(*p*-Tolyl)picolinonitrile (7g).** Yield 75%, colorless solid. HPLC: 96%,  $t_R$  = 6.71 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.37 (s, 3H), 7.35 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 7.73 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 8.08 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 8.31 (dd,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 9.07 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 20.8, 117.7, 127.2 (2C), 129.1, 129.9 (2C), 130.8, 132.3, 134.9, 138.9, 139.2, 149.0.

**(4-(5-Methylpyridin-2-yl)phenyl)methanol (9e).** Yield 62%, colorless solid. HPLC: 99%,  $t_R$  = 0.83 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.33 (s, 3H), 4.55 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H), 5.21 (t,  $J$  = 5.7 Hz, OH), 7.41 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.67 (m, 1H), 7.83 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 8.01 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 8.48 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 17.6, 62.6, 119.4, 125.9 (2C), 126.7 (2C), 131.5, 137.1, 137.4, 1143.1, 149.7, 153.3.

**(4-(6-Fluoropyridin-3-yl)phenyl)methanol (9f).** Yield 27%, colorless solid. HPLC: 99%,  $t_R$  = 3.55 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.61 (s, 2H), 6.96 (dd,  $J$  = 8.5 Hz,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 7.40 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.45 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.93 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz,  $J$  = 2.6 Hz,  $J$  = 1.3 Hz, 1H), 8.31 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 63.0, 108.9 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 36 Hz), 126.2 (2C), 126.9 (2C), 134.1 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 4 Hz), 134.4, 139.1 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 7 Hz), 141.7, 144.8 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 15 Hz), 162.4 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 239 Hz).

**(4-(6-Methylpyridin-3-yl)phenyl)methanol (9h).** Yield 52%, colorless solid. HPLC: 93%,  $t_R$  = 0.81 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.50 (s, 3H), 4.54 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H), 5.23 (t,  $J$  = 5.7 Hz, OH), 7.32 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.42 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.65 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 7.94 (dd,  $J$  = 8.1 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 8.73 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 23.6, 62.6, 123.1, 126.3 (2C), 127.1 (2C), 132.6, 134.2, 135.5, 142.2, 146.7, 156.7.

**2-Fluoro-5-(6-methylpyridin-3-yl)benzonitrile (16a).** Yield 87%, colorless solid. HPLC: 99%,  $t_R$  = 1.75 min.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.75 (2, 3H), 7.36 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.41 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.81 (dd,  $J$  = 11.9 Hz,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 7.91 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 8.73 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 23.0, 102.9 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 17 Hz), 113.5, 117.7 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 23 Hz), 124.9, 132.0, 132.1, 133.7 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 8 Hz), 134.2, 137.0, 145.0, 157.4, 163.3 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 263 Hz).

**2-Fluoro-5-(5-methylpyridin-2-yl)benzonitrile (16b).** Yield 91%, colorless solid. HPLC: 91%,  $t_R$  = 2.61 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.34 (s, 3H), 7.61 (t,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.96 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 8.46 (ddd,  $J$  = 8.8 Hz, 5.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 8.52 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 8.54 (dd,  $J$  = 6.3 Hz, 2.4 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 17.6, 100.6 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 16 Hz), 113.9, 116.9 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 21 Hz), 119.9,



131.3, 132.9, 133.6 (d,  $J_{C-F}$  = 8 Hz), 136.1 (d,  $J_{C-F}$  = 4 Hz), 137.8, 149.9, 150.3, 162.6 (d,  $J_{C-F}$  = 257 Hz).

**6'-Fluoro-5-methyl-2,3'-bipyridine (16c).** Yield 99%, orange solid. HPLC: 92%,  $t_R$  = 1.31 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.35 (s, 3H), 7.28 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 2.7 Hz, 1H), 7.74 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 2.2 Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 8.53 (dd,  $J$  = 1.5 Hz, 0.7 Hz, 1H), 8.59 (m, 1H), 8.88 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 17.5, 109.5 (d,  $J_{C-F}$  = 36 Hz), 119.5, 128.7 (d,  $J_{C-F}$  = 10 Hz), 131.4 (d,  $J_{C-F}$  = 16 Hz), 132.7, 132.8 (d,  $J_{C-F}$  = 4 Hz), 137.7, 139.8 (d,  $J_{C-F}$  = 8 Hz), 145.5 (d,  $J_{C-F}$  = 16 Hz), 150.0, 163.2 (d,  $J_{C-F}$  = 237 Hz).

**General Procedure B: Radical Bromination (8a–d,g; 17a–c).<sup>9</sup>**

The substituted toluene (1.00 equiv) was diluted in 20 mL of  $CCl_4$  and NBS (0.95 equiv) and AIBN (5 mg per mmol) were added in portions over a period of 1 h. The reaction mixture was heated to reflux for 16 h. After cooling to rt, the mixture was diluted with water and  $CCl_4$  was evaporated. The residue was extracted with EtOAc and washed with brine. The organic layers were dried over  $MgSO_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using a mixture of cyclohexane/EtOAc.

**4'-(Bromomethyl)-4-fluoro-[1,1'-biphenyl]-2-carbonitrile (8a).** 8a was synthesized according to the literature procedure by Schmidt et al.<sup>9</sup>

**4-(Bromomethyl)-4'-fluoro-1,1'-biphenyl (8b).** Yield 52%, colorless solid. HPLC: 87%,  $t_R$  = 8.39 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.76 (s, 2H), 7.29 (m, 2H), 7.53 (m, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.72 (m, 2H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 34.2, 115.6, 115.8, 126.9 (2C), 128.6, 128.7, 129.9 (2C), 136.0 (d,  $J_{C-F}$  = 2 Hz), 137.1, 139.0, 162.0 (d,  $J_{C-F}$  = 245 Hz).

**2-(4-(Bromomethyl)phenyl)-5-fluoropyridine (8c).** Yield 65%, colorless solid. HPLC: 61%,  $t_R$  = 7.15 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.67 (s, 2H), 7.55 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.82 (dd,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 8.03 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 8.03 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 8.66 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 34.5, 122.2, 124.6 (d,  $J_{C-F}$  = 24 Hz), 127.2, 127.8, 130.2, 132.7, 138.0 (d,  $J_{C-F}$  = 24 Hz), 139.2, 152.6, 159.1 (d,  $J_{C-F}$  = 245 Hz).

**6-(4-(Bromomethyl)phenyl)nicotinonitrile (8d).** Yield 89%, pale yellow solid. HPLC: 73%,  $t_R$  = 7.26 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.78 (s, 2H), 7.61 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.78 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 8.20 (m, 1H), 9.11 (m, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 34.2, 108.0, 117.6, 121.0, 128.2, 130.4, 132.9, 141.5, 144.5, 153.2, 158.4.

**5-(4-(Bromomethyl)phenyl)picolinonitrile (8g).** Yield 64%, colorless solid. HPLC: 96%,  $t_R$  = 7.17 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.78 (s, 2H), 7.62 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.84 (m, 2H), 8.12 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 8.36 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 2.3 Hz, 1H), 9.11 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 33.7, 117.6, 127.7 (2C), 129.8, 130.2 (2C), 131.3, 135.1, 135.4, 138.4, 139.3, 149.3.

**5-(6-(Bromomethyl)pyridin-3-yl)-2-fluorobenzonitrile (17a).** Yield 22%, pale yellow solid. HPLC: 85%,  $t_R$  = 6.77 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.70 (d,  $J$  = 63.6 Hz, 2H), 7.36 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.61 (dd,  $J$  = 20.0 Hz,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.85 (m, 3H), 8.75 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 29.9, 113.5, 117.7 (d,  $J_{C-F}$  = 21 Hz), 124.1, 132.2, 133.3, 133.8 (d,  $J_{C-F}$  = 8 Hz), 134.6 (d,  $J_{C-F}$  = 4 Hz), 136.0, 147.4, 156.8, 163.3 (d,  $J_{C-F}$  = 251 Hz).

**5-(5-(Bromomethyl)pyridin-2-yl)-2-fluorobenzonitrile (17b).** Yield 39%, beige solid. HPLC: 85%,  $t_R$  = 6.77 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.80 (s, 2H), 7.65 (t,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 2.3 Hz, 1H), 8.08 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 8.50 (ddd,  $J$  = 8.7 Hz, 5.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 8.59 (dd,  $J$  = 6.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 8.76 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 30.6, 100.8 (d,  $J_{C-F}$  = 25 Hz), 113.9, 117.1 (d,  $J_{C-F}$  = 15 Hz), 120.5, 131.9, 133.8, 134.1 (d,  $J_{C-F}$  = 15 Hz), 135.5, 138.3, 150.1, 152.7, 162.9 (d,  $J_{C-F}$  = 256 Hz).

**5-(Bromomethyl)-6'-fluoro-2,3'-bipyridine (17c).** Yield 45%, orange solid. HPLC: 76%,  $t_R$  = 4.92 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.80 (s, 2H), 7.31 (dd,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 2.9 Hz, 1H),

8.00 (dd,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 8.05 (dd,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 0.7 Hz, 1H), 8.63 (m, 1H), 8.76 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.92 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 30.6, 109.7, 120.5, 132.8, 133.6, 138.2, 140.3, 146.1, 149.9, 150.1, 163.5 (d,  $J_{C-F}$  = 245 Hz).

**General Procedure C: Bromination of the Benzylic Alcohols (8e,f,g).** To a solution of the benzylic alcohol 9e,f,g (2.50 equiv) in toluene (10 mL per mmol) was added phosphorus tribromide (1.00 equiv). The reaction mixture was refluxed at 110 °C for 3 h. After cooling to rt, the solvent was evaporated under a reduced pressure. The crude product was used for the next reaction without any purification.

**General Procedure D: Preparation of Thioethers by Nucleophilic Substitution (1; 12a;13b–h; 18a–c).** To a solution of the mercaptan (1.00 equiv) in DMF (10 mL per mmol) was added 4 N NaOH. The mixture was stirred at rt for 15 min. Afterward the benzylic bromide (1.25 equiv) was added and the reaction mixture was stirred at rt for another 6 h. The formed precipitate is filtered off, washed once with a small amount of DMF and then thoroughly with EtOH. The product was dried under reduced pressure.

Purification of compounds, which did not precipitate in DMF, was performed as follows. The mixture was diluted with EtOAc. The separated organic layer was washed with brine several times, dried over  $MgSO_4$  and dried under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using silica gel and a mixture of cyclohexane/EtOAc or by automated flash chromatography using a reversed phase C18 high performance column (RediSep) and a mixture of MeCN/ $H_2O$ .

**4'-(((5-(2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio)methyl)-4-fluoro-[1,1'-biphenyl]-2-carbonitrile (1).** 1 was synthesized according to the literature procedure by Schmidt et al.<sup>9</sup>

**4'-(((5-(1H-Benzo[d]imidazol-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio)methyl)-4-fluoro-[1,1'-biphenyl]-2-carbonitrile (12a).** Yield 13%, colorless solid. HPLC: 95%,  $t_R$  = 5.53 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.68 (s, 2H), 7.57 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.66 (m, 4H), 7.77 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.83 (dd,  $J$  = 8.4 Hz,  $J$  = 1.4 Hz, 1H), 7.95 (m, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.42 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 35.5, 111.6 (d,  $J_{C-F}$  = 10 Hz), 116.6, 117.4 (d,  $J_{C-F}$  = 27 Hz), 120.3 (d,  $J_{C-F}$  = 7 Hz), 120.5, 121.0 (d,  $J_{C-F}$  = 21 Hz), 122.6 (d,  $J_{C-F}$  = 23 Hz), 125.5, 129.0 (2C), 129.4 (2C), 132.4 (d,  $J_{C-F}$  = 8 Hz), 136.2, 137.5, 139.6, 140.8 (d,  $J_{C-F}$  = 3 Hz), 144.3, 144.5, 160.8 (d,  $J_{C-F}$  = 246 Hz), 162.6, 166.2. EI-MS,  $m/z$  (%): 427 (20,  $[M^+]$ ), 428 (5,  $[M^+ + H]$ ).

**2-(2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-5-(((4'-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)-1,3,4-oxadiazole (13b).** Yield 48%, colorless solid. HPLC: 99%,  $t_R$  = 8.72 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.32 (m, 4H), 4.60 (s, 2H), 7.04 (d,  $J$  = 8.4, 1H), 7.27 (td,  $J$  = 6.7 Hz, 3.4 Hz, 2H), 7.39 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.54 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.62 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.69 (m, 2H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 35.6, 64.0, 64.4, 115.0, 115.6, 115.7, 115.9, 118.1, 119.9, 126.8 (2C), 128.5, 128.6, 129.6 (2C), 135.9, 136.0, 138.5, 143.8, 146.7, 161.9 (d,  $J_{C-F}$  = 245 Hz, 1C), 162.5, 164.9. EI-MS,  $m/z$  (%): 420 (16,  $[M^+]$ ), 421 (5,  $[M^+ + H]$ ).

**2-(2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-5-(4-(5-fluoropyridin-2-yl)benzylthio)-1,3,4-oxadiazole (13c).** Yield 66%, colorless solid. HPLC: 96%,  $t_R$  = 8.09 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.31 (dd,  $J$  = 12.6 Hz,  $J$  = 5.0 Hz, 4H), 4.61 (s, 2H), 7.04 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.57 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.80 (td,  $J$  = 8.7 Hz,  $J$  = 2.9 Hz, 1H), 8.05 (m, 3H), 8.63 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 35.6, 64.1, 64.4, 115.1, 115.9, 118.1, 119.9, 121.7 (d,  $J_{C-F}$  = 5 Hz), 124.1 (d,  $J_{C-F}$  = 18 Hz), 126.6 (2C), 129.5 (2C), 137.1, 137.3, 137.5 (d,  $J_{C-F}$  = 6 Hz), 143.8, 146.7, 152.2 (d,  $J_{C-F}$  = 4 Hz), 158.6 (d,  $J_{C-F}$  = 254 Hz), 162.5, 165.0. EI-MS,  $m/z$  (%): 421 (20,  $[M^+]$ ), 422 (4,  $[M^+ + H]$ ).

**6-(4-(((5-(2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio)methyl)phenyl)nicotinonitrile (13d).** Yield 51%, colorless solid. HPLC: 95%,  $t_R$  = 7.89 min.  $^1H$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.31 (dtd,  $J$  = 2.1 Hz,  $J$  = 3.5 Hz, 4.3 Hz,

4H), 4.63 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.38 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J = 2.1$  Hz,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.14 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.18 (dd,  $J = 0.6$  Hz,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.37 (dd,  $J = 2.2$  Hz,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 9.07 (dd,  $J = 0.6$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 35.6, 64.0, 64.4, 107.4, 115.0, 115.9, 117.2, 118.1, 119.9, 120.2, 127.4 (2C), 127.9 (2C), 136.3, 139.4, 140.9, 143.8, 146.7, 152.5, 158.6, 162.4, 164.6. EI-MS,  $m/z$  (%): 428 (38,  $[\text{M}^+]$ ).

**2-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-(4-(5-methylpyridin-2-yl)benzylthio)-1,3,4-oxadiazole (13e).** Yield 27%, colorless solid. HPLC: 98%,  $t_R = 5.26$  min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.33 (s, 3H), 4.32 (ddd,  $J = 5.2$  Hz,  $J = 4.5$  Hz,  $J = 1.6$  Hz, 4H), 4.61 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.40 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.56 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.68 (dd,  $J = 8.2$  Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.84 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 8.02 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 8.49 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 17.6, 35.8, 64.0, 64.4, 115.0, 115.9, 118.1, 119.6, 119.9, 126.4 (2C), 129.4 (2C), 131.9, 137.1, 137.5, 138.1, 143.8, 146.7, 149.7, 152.8, 162.5, 164.9. EI-MS,  $m/z$  (%): 417 (32,  $[\text{M}^+]$ ).

**2-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-(4-(6-fluoropyridin-3-yl)benzylthio)-1,3,4-oxadiazole (13f).** Yield 58%, colorless solid. HPLC: 98%,  $t_R = 8.10$  min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.32 (m, 4H), 4.61 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.27 (dd,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.38 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.70 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 8.27 (td,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 8.53 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 35.6, 64.1, 64.4, 109.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 37$  Hz), 115.1, 115.9, 118.1, 119.9, 127.0 (2C), 129.8 (2C), 133.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 4$  Hz), 135.2 (d,  $J_{\text{C-F}} = 4$  Hz), 136.9, 140.3 (d,  $J_{\text{C-F}} = 9$  Hz), 143.8, 145.4 (d,  $J_{\text{C-F}} = 16$  Hz), 146.7, 162.5, 162.7 (d,  $J_{\text{C-F}} = 263$  Hz), 165.0. EI-MS,  $m/z$  (%): 421 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 422 (26,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 423 (8,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

**5-(4-(((5-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio)methyl)phenyl)picolinonitrile (13g).** Yield 58%, colorless solid. HPLC: 99%,  $t_R = 8.02$  min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.32 (ddd,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 3.5$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 4H), 4.63 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.38 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.64 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.82 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 8.11 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 8.33 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 9.09 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 35.5, 64.1, 64.4, 115.1, 155.9, 117.6, 118.2, 119.9, 127.5 (2C), 129.1, 130.0 (2C), 131.2, 134.6, 135.3, 138.3, 138.4, 143.8, 146.7, 149.2, 162.5, 165.0. EI-MS,  $m/z$  (%): 428 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 429 (28,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 430 (8,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

**2-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-(4-(6-methylpyridin-3-yl)benzylthio)-1,3,4-oxadiazole (13h).** Yield 12%, colorless solid. HPLC: 97%,  $t_R = 5.17$  min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = CH<sub>3</sub> fehlt, 4.32 (m, 4H), 4.61 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.39 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.57 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.66–7.69 (m, 2H), 7.95 (dd,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 8.73 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 24.1, 36.1, 64.6, 64.9, 114.9, 115.6, 116.4, 118.6, 120.4, 123.6, 127.2, 130.2, 132.6, 134.8, 136.9, 137.0, 144.3, 147.2, 157.4, 163.1, 165.5. EI-MS,  $m/z$  (%): 417 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 418 (26,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 419 (8,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

**2-(6-(((5-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio)methyl)pyridin-3-yl)-5-fluorobenzonitrile (18a).** Yield 33%, colorless solid. HPLC: 98%,  $t_R = 7.32$  min.  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.31 (dddd,  $J = 6.8$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 3.4 Hz, 1.6 Hz, 4H), 5.03 (s, 2H), 6.95 (m, 1H), 7.46 (dd,  $J = 2.0$  Hz,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 7.85 (ddd,  $J = 12.3$  Hz,  $J = 4.7$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 8.32 (m, 2H), 8.87 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 29.9, 64.4, 64.8, 102.5 (d,  $J_{\text{C-F}} = 6$  Hz), 114.4, 116.1, 116.1, 117.7 (d,  $J_{\text{C-F}} = 29$  Hz), 118.3, 120.6, 122.9, 128.4, 131.2, 132.4 (d,  $J_{\text{C-F}} = 7$  Hz), 133.8 (d,  $J_{\text{C-F}} = 8$  Hz), 134.0, 138.4, 144.1, 144.4, 149.8, 151.8, 155.4, 157.8 (d,  $J_{\text{C-F}} = 254$  Hz), 165.0. EI-MS:  $m/z$  = 463 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 464 (26,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 465 (7,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

**5-(5-(((5-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio)methyl)pyridin-2-yl)-2-fluorobenzonitrile (18b).** Yield 37%, colorless solid. HPLC: 99%,  $t_R = 7.58$  min.  $^1\text{H}$  NMR

(DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.32 (m, 4H), 4.64 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J = 8.5$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.65 (t,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 8.03 (dd,  $J = 8.3$  Hz, 2.2 Hz, 1H), 8.07 (dd,  $J = 8.2$  Hz, 0.5 Hz, 1H), 8.48 (ddd,  $J = 8.9$  Hz, 5.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 8.58 (dd,  $J = 6.2$  Hz, 2.3 Hz, 1H), 8.77 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 32.8, 64.1, 64.4, 95.2, 113.9, 115.1, 115.8, 117.0, 117.1, 118.1, 119.9, 120.3, 131.8, 132.8, 134.0 (d,  $J_{\text{C-F}} = 8$  Hz), 136.1, 138.0, 143.8, 146.7, 150.0, 152.2, 156.7, 163.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 356$  Hz). EI-MS,  $m/z$  (%): 446 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 447 (27,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 448 (8,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

**2-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-5-(((6'-fluoro-[2,3'-bipyridin]-5-yl)methylthio)-1,3,4-oxadiazole (18c).** Yield 31%, pale yellow solid. HPLC: 95%,  $t_R = 6.69$  min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.31 (ddd,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 3.6$  Hz, 2.1 Hz, 4H), 4.64 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J = 8.6$  Hz,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.01–8.05 (m, 2H), 8.61 (td,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 8.77 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.90 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 32.8, 64.0, 64.4, 109.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 39$  Hz), 115.1, 115.8, 118.1, 119.9, 120.3, 132.4 (d,  $J_{\text{C-F}} = 7$  Hz), 132.5, 137.9, 140.2 (d,  $J_{\text{C-F}} = 9$  Hz), 143.8, 145.8, 145.9, 146.7, 150.1, 151.9, 162.4, 163.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 356$  Hz). EI-MS,  $m/z$  (%): 422 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 423 (36,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 424 (11,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

**Methyl 1-(2-Cyano-4-fluorophenyl)piperidine-4-carboxylate (21).** Methylpiperidine-4-carboxylate (0.62 g, 4.32 mmol, 1.20 equiv) and 2,5-difluorobenzonitrile (0.50 g, 3.60 mmol, 1.00 equiv) were dissolved in 10 mL of DMSO. Cesium carbonate (1.41 g, 4.32 mmol, 1.2 equiv) was added, and the reaction mixture was stirred at 100 °C for 18 h. After cooling to rt, the reaction mixture was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 4:1) gave (0.39 g, 42%) compound **20** as a colorless solid. HPLC: 98%,  $t_R = 6.93$  min.  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 2.03 (m, 4H), 2.48 (m, 1H), 2.86 (m, 2H), 3.43 (ddd,  $J = 3.16$  Hz,  $J = 6.95$  Hz,  $J = 8.38$  Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 7.00 (dd,  $J = 4.61$  Hz,  $J = 9.02$  Hz, 1H), 7.20 (ddd,  $J = 3.05$  Hz,  $J = 7.79$  Hz,  $J = 9.02$  Hz, 1H), 7.26 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 28.5(2C), 40.5, 51.9(2C), 52.1, 56.7, 107.9 (d,  $J_{\text{C-F}} = 9$  Hz), 112.7 (d,  $J_{\text{C-F}} = 8$  Hz), 117.1, 120.5 (d,  $J_{\text{C-F}} = 25$  Hz), 120.8 (d,  $J_{\text{C-F}} = 8$  Hz), 121.1 (d,  $J_{\text{C-F}} = 23$  Hz), 153.1, 157.1 (d,  $J_{\text{C-F}} = 243$  Hz), 175.0.

**5-Fluoro-2-(4-(hydroxymethyl)piperidin-1-yl)benzonitrile (22).** To a solution of **21** (0.34 g, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in anhydrous THF (15 mL) was added lithium borohydride (1.9 mL, 3.38 mmol, 2.60 equiv). The mixture was heated to reflux for 16 h under argon atmosphere. After cooling to rt, the reaction mixture was diluted carefully with water and extracted with EtOAc. The combined organic layer was washed with brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. After removal of the solvent compound **22** (0.30 g, 98%) was obtained as a pale yellow solid. HPLC: 99%,  $t_R = 4.94$  min.  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 1.51 (ddd,  $J = 3.91$  Hz,  $J = 12.42$  Hz,  $J = 24.3$  Hz, 2H), 1.60–1.69 (m, 1H), 1.87 (dd,  $J = 1.62$  Hz,  $J = 12.42$  Hz, 2H), 2.76 (td,  $J = 1.62$  Hz,  $J = 12.42$  Hz, 2H), 3.49 (d,  $J = 11.95$  Hz, 2H), 3.56 (d,  $J = 6.47$  Hz, 2H), 6.98 (dd,  $J = 4.43$  Hz,  $J = 9.19$  Hz, 1H), 7.18 (ddd,  $J = 2.95$  Hz,  $J = 7.99$  Hz,  $J = 9.19$  Hz, 1H), 7.24 (dd,  $J = 2.95$  Hz,  $J = 7.99$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 29.2 (2C), 38.3, 52.8 (2C), 67.8, 107.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 9$  Hz), 117.3 (d,  $J_{\text{C-F}} = 2$  Hz), 120.3 (d,  $J_{\text{C-F}} = 26$  Hz), 120.7 (d,  $J_{\text{C-F}} = 8$  Hz, 1C), 121.1 (d,  $J_{\text{C-F}} = 23$  Hz), 153.5, 156.9 (d,  $J_{\text{C-F}} = 243$  Hz).

**2-(4-(Bromomethyl)piperidin-1-yl)-5-fluorobenzonitrile (23).** Anhydrous conditions and inert gas are essential for this reaction! **22** (0.18 g, 0.77 mmol, 1.00 equiv), tetrabromomethane (0.38 g, 1.15 mmol, 1.50 equiv), and triphenylphosphine (0.40 g, 1.55 mmol, 2.00 equiv) were added in a dried vessel and purged for 15 min with argon. Afterward the educts were dissolved in dry acetonitrile. The reaction mixture was stirred at rt. The progression of the reaction was controlled by HPLC. After no further conversion was observed, the reaction was stopped by addition of 15% NaOH solution. The reaction mixture was extracted with DCM. The combined organic layer was



washed with brine and dried over  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 9:1) to give **23** (0.08 g, 35%) as a brown oil. HPLC: 97%,  $t_R$  = 8.41 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 1.43 (qd,  $J$  = 3.80 Hz,  $J$  = 11.94 Hz, 2H), 1.73–1.81 (m, 1H), 1.89 (d,  $J$  = 12.25 Hz, 2H), 2.77 (td,  $J$  = 2.09 Hz,  $J$  = 11.94 Hz, 2H), 3.41 (d,  $J$  = 12.25 Hz, 2H), 3.54 (d,  $J$  = 6.13 Hz, 2H), 7.20 (dd,  $J$  = 4.73 Hz,  $J$  = 8.99 Hz, 1H), 7.47 (ddd,  $J$  = 0.66 Hz,  $J$  = 3.11 Hz,  $J$  = 8.73 Hz,  $J$  = 8.99 Hz, 1H), 7.68 (dd,  $J$  = 3.11 Hz,  $J$  = 8.32 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 30.5 (2C), 37.2, 39.9, 51.7 (2C), 106.3 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 11 Hz), 116.9 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 2 Hz), 120.2 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 26 Hz), 121.3 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 8 Hz), 121.4 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 23 Hz), 152.9 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 3 Hz), 156.2 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 240 Hz).

**2-((5-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl-thio)methyl)piperidin-1-yl)-5-fluorobenzonitrile (24).** A mixture of **4b** (0.03 g, 0.14 mmol, 1.00 equiv) and potassium carbonate (0.02 g, 0.17 mmol, 1.20 equiv) was stirred in dry DMF (3.6 mL) at rt for 15 min. **23** (0.02 g, 0.17 mmol, 1.50 equiv) was added to the orange solution. Afterward the reaction mixture was stirred for 3 h at 80 °C under an argon atmosphere. The reaction mixture was diluted with water and EtOAc. The aqueous layer was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, successively dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 2:1) to give (0.05 g, 71%) compound **24** as a colorless solid. HPLC: 99%,  $t_R$  = 8.86 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 1.66 (ddd,  $J$  = 3.86 Hz,  $J$  = 12.18 Hz,  $J$  = 15.67 Hz, 2H), 2.01 (m, 1H), 2.07 (d,  $J$  = 13.17 Hz, 2H), 2.84 (td,  $J$  = 1.75 Hz,  $J$  = 11.82 Hz, 2H), 3.28 (d,  $J$  = 6.82 Hz, 2H), 3.51 (d,  $J$  = 12.05 Hz, 2H), 4.29–4.34 (m, 4H), 6.96 (d,  $J$  = 8.32 Hz, 1H), 7.09 (dd,  $J$  = 4.60 Hz,  $J$  = 8.97 Hz, 1H), 7.21 (ddd,  $J$  = 2.99 Hz,  $J$  = 7.84 Hz,  $J$  = 8.97 Hz, 1H), 7.26–7.28 (m, 1H), 7.49–7.52 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 31.7 (2C), 35.4, 38.6, 52.8 (2C), 64.4, 64.8, 107.9 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 9 Hz), 116.1, 117.1, 118.2, 120.5, 120.6 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 25 Hz), 121.1, 121.2 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 12 Hz), 121.3, 144.0, 146.9, 151.8, 158.3, 164.8 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 232 Hz), 167.9. EI-MS,  $m/z$  (%): 452 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 453 (28,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ).

**4'-((5-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl-sulfonyl)methyl)-4-fluorobiphenyl-2-carbonitrile (rac)-25.** Under an argon atmosphere **1** (0.05 g, 0.11 mmol, 1.00 equiv) was dissolved in 8 mL of DCM. The solution was cooled to 0 °C, and *m*CPBA (0.03 g, 0.11 mmol, 1.00 equiv) was added. The reaction mixture was allowed to warm to rt and was stirred for 2 d. After confirmation of the completion of the reaction with HPLC, saturated sodium sulfite solution was added to the mixture. The organic layer was washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution and dried over  $\text{MgSO}_4$ . Purification was performed by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 1:1) to give (0.04 g, 79%) compound (*rac*)-**25** as a colorless solid. HPLC: 99%,  $t_R$  = 7.71 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.31–4.33 (m, 2H), 4.35–4.36 (m, 2H), 4.92 (q,  $J$  = 12.57 Hz, 2H), 7.09 (d,  $J$  = 8.56 Hz, 1H), 7.48–7.50 (m, 3H), 7.53 (dd,  $J$  = 2.11 Hz,  $J$  = 8.41 Hz, 1H), 7.56–7.57 (m, 1H), 7.57–7.58 (m, 1H), 7.62 (dd,  $J$  = 5.40 Hz,  $J$  = 8.56 Hz, 1H), 7.68 (td,  $J$  = 2.67 Hz,  $J$  = 8.56 Hz, 1H), 7.96 (dd,  $J$  = 2.67 Hz,  $J$  = 8.56 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 58.2, 64.2, 64.7, 111.8, 115.3, 115.9, 117.4, 118.5, 120.6 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 24 Hz), 120.9, 121.2 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 23 Hz), 129.2 (2C), 130.1, 131.0 (2C), 132.6 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 8 Hz), 137.2, 140.6, 144.1, 147.6, 165.0 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 243 Hz), 165.5. EI-MS,  $m/z$  (%): 461 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 445 (43,  $[\text{M}^+ - \text{O}]$ ), 462 (25,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 463 (6,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

**4'-((5-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl-sulfonyl)methyl)-4-fluorobiphenyl-2-carbonitrile (26).** Under argon atmosphere, **2** (0.03 g, 0.07 mmol, 1.00 equiv) was dissolved in 6 mL of DCM. The solution was cooled to 0 °C, and *m*CPBA (0.04 g, 0.20 mmol, 3.00 equiv) was added. The reaction mixture warmed to 30 °C and was stirred for 3 d. In the case of full implementation the reaction was stopped by adding saturated  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  solution. The organic layer was washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution and dried over  $\text{MgSO}_4$ . Purification was performed by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 1:1) to give (0.02 g,

68%) of compound **26** as a colorless solid. HPLC: 97%,  $t_R$  = 8.07 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.34 (ddd,  $J$  = 2.7 Hz, 5.9 Hz, 7.8 Hz, 4H), 5.33 (s, 2H), 7.09 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.44 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.50 (dd,  $J$  = 2.1 Hz,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.54 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.63 (m, 3H), 7.69 (td,  $J$  = 2.7 Hz,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.98 (dd,  $J$  = 2.7 Hz,  $J$  = 8.7 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 60.2, 64.1, 64.6, 111.7 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 10 Hz), 114.6, 116.0, 117.2, 118.4, 120.5 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 25 Hz), 121.1, 121.1 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 23 Hz), 126.8, 129.1 (2C), 131.7 (2C), 132.4 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 8 Hz), 137.7, 140.4, 143.9, 147.9, 160.7, 160.9 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 227 Hz), 165.9. EI-MS,  $m/z$  (%): 477 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 478 (28,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 479 (8,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

**4'-((5-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl-thio)methyl)-4-fluorobiphenyl-2-carboxamide (27).** Under an argon atmosphere, **2** (0.05 g, 0.11 mmol, 1.00 equiv) was added to a dried vessel. Trifluoroacetic acid (0.8 mL) and concentrated sulphuric acid (0.2 mL) were added, and the red mixture was stirred 6 h at 70 °C. Subsequently the reaction is poured into a water/ice mixture (50 mL), extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution, and dried over  $\text{MgSO}_4$ . Purification by column chromatography (cyclohexane/EtOAc 1:2) gave (0.04 g, 78%) compound **27** as a colorless solid. HPLC: 96%,  $t_R$  = 6.93 min.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 4.32 (td,  $J$  = 5.2 Hz,  $J$  = 3.7 Hz, 4H), 4.60 (s, 2H), 7.05 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.25 (dd,  $J$  = 9.1 Hz,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 7.31 (td,  $J$  = 8.6 Hz,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 7.38 (m, 3H), 7.41 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 7.45 (dd,  $J$  = 8.4 Hz,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.49 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz, 300 K):  $\delta$  (ppm) = 35.6, 64.1, 64.4, 114.3 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 21 Hz), 115.0, 115.9 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 21 Hz), 115.9, 118.1, 120.0, 128.6 (2C), 128.8 (2C), 132.0 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 8 Hz), 134.8, 135.5, 138.9, 139.0 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 7 Hz), 143.8, 146.7, 160.9 (d,  $J_{\text{C-F}}$  = 247 Hz), 162.7, 164.9, 169.5. EI-MS,  $m/z$  = 463 (100,  $[\text{M}^+]$ ), 464 (26,  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ ), 465 (7,  $[\text{M}^+ + 2\text{H}]$ ).

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01200.

Molecular docking, determination of aqueous solubility, in vitro activity in GSK-3 $\alpha$  (h) and GSK-3 $\beta$  (h), in vitro activity in AML cell lines, in vivo activity on golden zebrafish embryo (PDF)  
Molecular formula strings (CSV)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +49 6151 163075. Fax: +49 6151 163278. E-mail: Schmidt\_boris@t-online.de.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the students Martin Brodrecht, Anne Schieferdecker, and David Fiebig (Technische Universität Darmstadt), who supported this work. The authors thank Dennis Bensinger (Technische Universität Darmstadt) for help with scripting. We thank the Hans und Ilse Breuer-Stiftung for financial support. K.S. is a Leukemia and Lymphoma Society Scholar, and this work was supported in part by Grant R01 CA140292.

## ■ REFERENCES

- (1) Cohen, P.; Frame, S. The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2* (10), 769–776.
- (2) Frame, S.; Cohen, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **2001**, *359* (1), 1–16.

- (3) Dajani, R.; Fraser, E.; Roe, S. M.; Young, N.; Good, V.; Dale, T. C.; Pearl, L. H. Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ : Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition. *Cell* **2001**, *105* (6), 721–732.
- (4) Jope, R. S.; Johnson, G. V. W. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29* (2), 95–102.
- (5) Lei, P.; Ayton, S.; Bush, A. L.; Adlard, P. A. GSK-3 in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Alzheimer's Dis.* **2011**, *2011*, 189246.
- (6) McCubrey, J. A.; Steelman, L. S.; Bertrand, F. E.; Davis, N. M.; Sokolosky, M.; Abrams, S. L.; Montalto, G.; D'Assoro, A. B.; Libra, M.; Nicoletti, F.; Maestro, R.; Basecke, J.; Rakus, D.; Gizak, A.; Demidenko, Z.; Cocco, L.; Martelli, A. M.; Cervello, M. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget* **2014**, *5* (10), 2881–2911.
- (7) Bhat, R. V.; Budd Haerberlein, S. L.; Lindquist, J. M. Inhibition of GSK-3 as Therapeutic Strategy in Disease: Efficacy of AR-A014418. In *Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) and Its Inhibitors*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2006; pp 243–255.
- (8) Woodgett, J. R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* **1990**, *9*, 2431–8.
- (9) Lo Monte, F.; Kramer, T.; Gu, J.; Anumala, U. R.; Marinelli, L.; La Pietra, V.; Novellino, E.; Franco, B.; Demedts, D.; Van Leuven, F.; Fuertes, A.; Dominguez, J. M.; Plotkin, B.; Eldar-Finkelman, H.; Schmidt, B. Identification of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitors with a Selective Sting for Glycogen Synthase Kinase-3 $\alpha$ . *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (9), 4407–4424.
- (10) Banerji, V.; Frumm, S. M.; Ross, K. N.; Li, L. S.; Schinzel, A. C.; Hahn, C. K.; Kakoza, R. M.; Chow, K. T.; Ross, L.; Alexe, G.; Tolliday, N.; Inguilizian, H.; Galinsky, I.; Stone, R. M.; DeAngelo, D. J.; Roti, G.; Aster, J. C.; Hahn, W. C.; Kung, A. L.; Stegmaier, K. The intersection of genetic and chemical genomic screens identifies GSK-3 $\alpha$  as a target in human acute myeloid leukemia. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (3), 935–947.
- (11) Kaidanovich-Beilin, O.; Woodgett, J. R. GSK-3: functional insights from cell biology and animal models. *Front. Mol. Neurosci.* **2011**, *4*, 1–40.
- (12) MacAulay, K.; Doble, B. W.; Patel, S.; Hansotia, T.; Sinclair, E. M.; Drucker, D. J.; Nagy, A.; Woodgett, J. R. Glycogen Synthase Kinase 3 $\alpha$ -Specific Regulation of Murine Hepatic Glycogen Metabolism. *Cell Metab.* **2007**, *6* (4), 329–337.
- (13) Kaidanovich-Beilin, O.; Lipina, T.; Takao, K.; van Eede, M.; Hattori, S.; Laliberté, C.; Khan, M.; Okamoto, K.; Chambers, J.; Fletcher, P.; MacAulay, K.; Doble, B.; Henkelman, M.; Miyakawa, T.; Roder, J.; Woodgett, J. Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3 $\alpha$  mutant mice. *Mol. Brain* **2009**, *2* (1), 1–23.
- (14) Hoeflich, K. P.; Luo, J.; Rubie, E. A.; Tsao, M.-S.; Jin, O.; Woodgett, J. R. Requirement for glycogen synthase kinase-3[beta] in cell survival and. *Nature* **2000**, *406* (6791), 86–90.
- (15) Brown, C. M. S.; Larsen, S. R.; Iland, H. J.; Joshua, D. E.; Gibson, J. Leukaemias into the 21st century: part 1: the acute leukaemias. *Intern. Med. J.* **2012**, *42* (11), 1179–1186.
- (16) Elert, E. Living with leukaemia. *Nature* **2013**, *498* (7455), S2–S3.
- (17) *Molecular Operating Environment (MOE)*, version 2014.09; Chemical Computing Group Inc. (1010 Sherbooke Street West, Suite No. 910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7), 2014.
- (18) Neudert, G.; Klebe, G. DSX: A Knowledge-Based Scoring Function for the Assessment of Protein–Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51* (10), 2731–2745.
- (19) Cerep. GSK3alpha. [http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche\\_CondExp\\_Test.asp?test=2842](http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche_CondExp_Test.asp?test=2842) (accessed Mar 26, 2013).
- (20) Cerep. GSK3beta. [http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche\\_CondExp\\_Test.asp?test=2879](http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche_CondExp_Test.asp?test=2879) (accessed Mar 26, 2013).
- (21) *ChemBioDraw Ultra*, version 13.0.2, 2013.
- (22) Meijer, L.; Skaltsounis, A.-L.; Magiatis, P.; Polychronopoulos, P.; Knockaert, M.; Leost, M.; Ryan, X. P.; Vonica, C. A.; Brivanlou, A.; Dajani, R.; Crovace, C.; Tarricone, C.; Musacchio, A.; Roe, S. M.; Pearl, L.; Greengard, P. GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins. *Chem. Biol.* **2003**, *10* (12), 1255–1266.
- (23) Henderson, J. L.; Kormos, B. L.; Hayward, M. M.; Coffman, K. J.; Jasti, J.; Kurumbail, R. G.; Wager, T. T.; Verhoest, P. R.; Noell, G. S.; Chen, Y.; Needle, E.; Berger, Z.; Steyn, S. J.; Houle, C.; Hirst, W. D.; Galatsis, P. Discovery and Preclinical Profiling of 3-[4-(Morpholin-4-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl]benzonitrile (PF-06447475), a Highly Potent, Selective, Brain Penetrant, and in Vivo Active LRRK2 Kinase Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (1), 419–432.
- (24) *Test Guideline 107*; OECD: Paris, 1981.
- (25) Nishiyama, N.; Oku, Y.; Kumagai, Y.; Sato, Y.; Yamaguchi, E.; Sasaki, A.; Shoji, M.; Ohnishi, Y.; Okamoto, H.; Uehara, Y. A Zebrafish Chemical Suppressor Screening Identifies Small Molecule Inhibitors of the Wnt/ $\beta$ -catenin Pathway. *Chem. Biol. (Oxford, U. K.)* **2014**, *21* (4), 530–540.
- (26) Hassan, F. G.; Mohaimen, N. A.; Al-Maliki, J. G. The Wnt signal pathways. *Int. J. Adv. Res.* **2014**, *2* (8), 816–822.
- (27) Paquet, D.; Bhat, R.; Sydow, A.; Mandelkow, E.-M.; Berg, S.; Hellberg, S.; Fälting, J.; Distel, M.; Köster, R. W.; Schmid, B.; Haass, C. A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119* (5), 1382–1395.



## Elastase-like Activity Is Dominant to Chymotrypsin-like Activity in 20S Proteasome's $\beta 5$ Catalytic Subunit

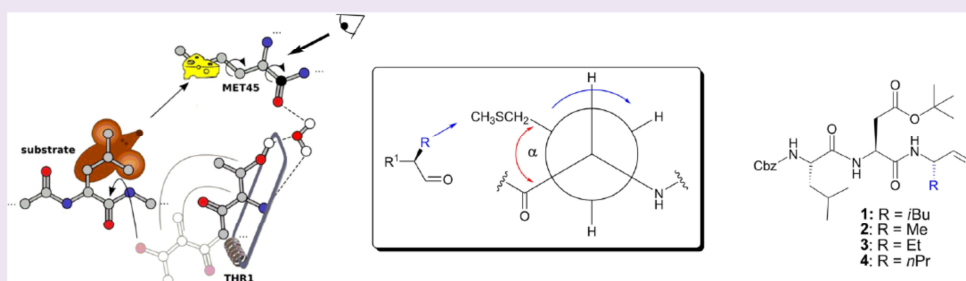
Dennis Bensinger,<sup>†,||</sup> Theresa Neumann,<sup>†,||</sup> Christoph Scholz,<sup>†</sup> Constantin Voss,<sup>†</sup> Sabine Knorr,<sup>‡</sup> Ulrike Kuckelkorn,<sup>§</sup> Kay Hamacher,<sup>‡</sup> Peter-Michael Kloetzel,<sup>§</sup> and Boris Schmidt<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Clemens Schöpf Institute for Organic Chemistry & Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Alarich Weiss Str. 4-8, 64287 Darmstadt, Germany

<sup>‡</sup>Computational Biology & Simulation, Technische Universität Darmstadt, Schnittspahnstr. 10, 64287 Darmstadt, Germany

<sup>§</sup>Institute of Biochemistry CCM, Charité Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1/Virchowweg 6, 10117 Berlin, Germany

### S Supporting Information



**ABSTRACT:** The ubiquitin/proteasome system is the major protein degradation pathway in eukaryotes with several key catalytic cores. Targeting the  $\beta 5$  subunit with small-molecule inhibitors is an established therapeutic strategy for hematologic cancers. Herein, we report a mouse-trap-like conformational change that influences molecular recognition depending on the substitution pattern of a bound ligand. Variation of the size of P1 residues from the highly  $\beta 5$ -selective proteasome inhibitor BSc2118 allows for discrimination between inhibitory strength and substrate conversion. We found that increasing molecular size strengthens inhibition, whereas decreasing P1 size accelerates substrate conversion. Evaluation of substrate hydrolysis after silencing of  $\beta 5$  activity reveals significant residual activity for large residues exclusively. Thus, classification of the  $\beta 5$  subunit as chymotrypsin-like and the use of the standard tyrosine-containing substrate should be reconsidered.

The proteome, the entirety of proteins in an organism at a given time, underlies a complex and dynamic equilibrium between protein synthesis and degradation. In eukaryotes, the ubiquitin/proteasome system (UPS) is the major ATP-dependent degradation pathway. Ubiquitin, a small 8 kDa protein, is covalently attached to a substrate, which is subsequently recognized and degraded to small fragments by the 26S proteasome.<sup>1</sup> This 26S proteasome is a 2.5 MDa multicatalytic threonine protease complex that consists of two regulatory 19S subunits, which recognize and unfold ubiquitinated substrates, and a cylinder-shaped core particle (CP), the 20S proteasome, which harbors the active sites. The CP consists of 28 subunits with an  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$  symmetry and features six active sites bearing three different substrate specificities, classified as caspase-like activity (C-like,  $\beta 1$ ) because of its tendency to cleave peptides on the carboxyl side of glutamyl or aspartyl side chains, the trypsin-like activity (T-like,  $\beta 2$ ) due to the cleavage after basic P1 residues, and the chymotrypsin-like activity (ChT-like,  $\beta 5$ ) which is thought to predominantly attack the carboxylic side of aromatic or bulky hydrophobic residues.<sup>2</sup> The observed specificities arise from the

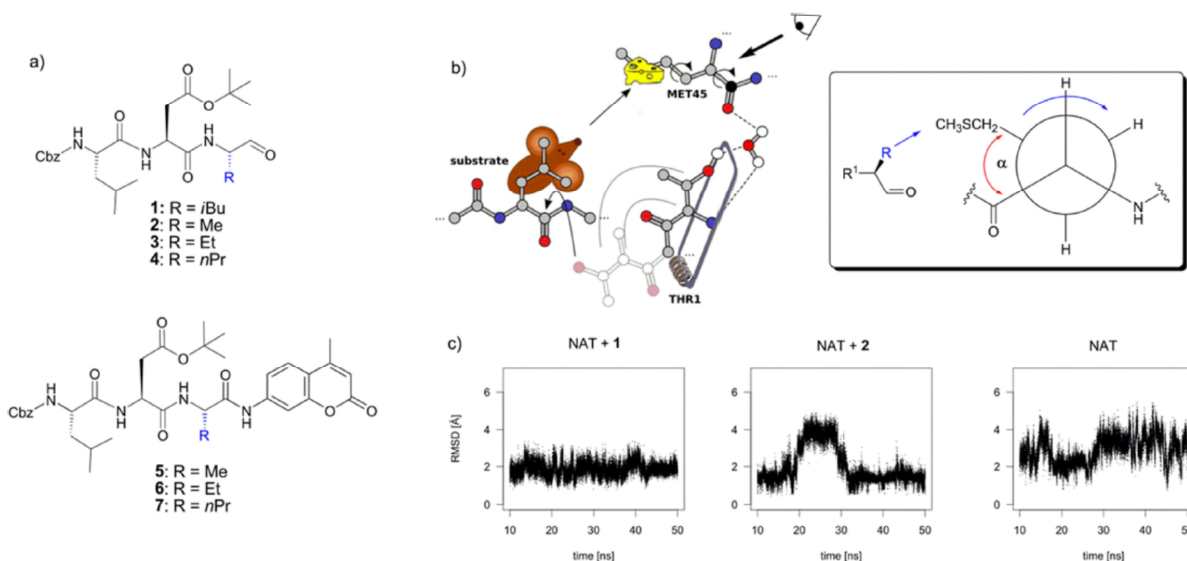
unique shape of the substrate binding pockets which are named S1–S4 in the N-terminal and S1'–S4' in the C-terminal direction of a bound substrate, emanating from its cleavage position, which is the alcohol oxygen of Thr<sup>1</sup> (Thr<sup>1</sup>O<sup>γ</sup>). Ligand parts reaching the substrate binding pockets follow a similar nomenclature where S is substituted by P.

The UPS is involved in several physiologically important cellular processes such as cell cycle progression, immune response, or signal transduction, which makes the CP an attractive therapeutic target for cancer and autoimmune disorders.<sup>3–6</sup> In fact, the dipeptidic boronic acid bortezomib and the tetrapeptidic epoxyketone carfilzomib are currently prescriptive drugs against various types of cancer, in particular relapsed multiple myeloma and mantle cell lymphoma.<sup>5,6</sup> Particularly, the  $\beta 5$  subunit is in the focus of therapeutic targeting, because its inhibition leads to high rates of apoptosis in tumor cells, which is accompanied by a protective effect on

Received: January 11, 2016

Accepted: April 25, 2016

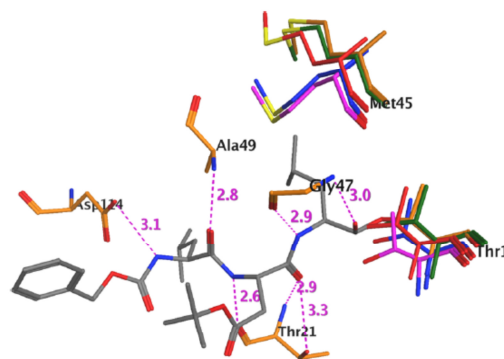
**Scheme 1.** (a) Chemical Structures of the Tripeptidic Aldehyde Inhibitor **1** and Derivatives with Gradually Elongated P1 Residues 2–4 and the Analogue Substrate Derivates 5–7; (b) Visualization of the Molecular Recognition in a Mouse Trap Analogy;<sup>a</sup> (c) Molecular Dynamics Simulation of the Native  $\beta 5$  Subunit with Bound Inhibitors **1** and **2** and without Any Ligand<sup>b</sup>



<sup>a</sup>Hydrophobic interactions between Met<sup>45</sup> and the ligand's P1 residue lead to conformational changes of the S1 subpocket's backbone. <sup>b</sup>The RMSD of the Met<sup>45</sup> side chain atoms relative to the starting frame is plotted over time. Calculations were done in VMD 2.9.

healthy cells.<sup>7</sup> In 2005, we identified the tripeptidic aldehyde BSc2118 (**1**; Scheme 1a) as a very potent ( $IC_{50/\beta 5} = 58$  nM) and selective covalent CP inhibitor.<sup>8</sup> The special feature of **1** is a sterically demanding *tert*-butyl aspartate P2 residue, which discriminates inhibition against the majority of the protease environment. In a recent study, **1** shows cytotoxic effect against human tumor cells and efficacy in multiple myeloma xenografts.<sup>9</sup>

In this work, we investigated a ligand recognition mechanism leading to novel insights as a function of P1 residues on inhibitory activity as well as substrate hydrolysis. Our starting hypothesis was that ligand association and dissociation is influenced by hydrophobic interactions between a substrate's P1 residue and the highly flexible side chain of Met<sup>45</sup> within the proteasome's  $\beta 5$  subunit.<sup>2</sup> For example, in the **1**/proteasome complex,<sup>8</sup> Met<sup>45</sup> shows a dihedral angle  $\alpha$  of about  $-167^\circ$  compared to  $+48^\circ$  in the native protein (Figure 1).<sup>10</sup> Interestingly, the dihedral angle is changed in a similar manner by a variety of inhibitors bearing P1 residues such as the ketoamide BSc4999<sup>11</sup> ( $\alpha = -179^\circ$ ), the natural product syringolin A<sup>12</sup> ( $\alpha = -175^\circ$ ), as well as the boronic acid bortezomib<sup>13</sup> ( $\alpha = -174^\circ$ ), while inhibitors not occupying S1 like the recently reported indolo-phakellins<sup>14</sup> retain the native conformation ( $\alpha = +51^\circ$ ) of Met<sup>45</sup>. A concerted mechanism may accelerate the association of substrates with large P1 residues due to a widening of the dihedral angle  $\alpha$  of Met<sup>45</sup>. This induced fit was thought to imply a conformational change of the S1 subpocket's backbone, which would strengthen the coordination of a catalytically active water molecule and increase the nucleophilicity of Thr<sup>1</sup>O<sup>-</sup>. An illustrative analogy for this triggered activation is the release of a mouse trap after the mouse touches the lure (Scheme 1b).



**Figure 1.** Comparison of the native (blue,  $\alpha = +48^\circ$ ) and **1**-bound proteasome (gray in orange,  $\alpha = -167^\circ$ ) structures detailing two distinct side chain conformations of Met<sup>45</sup>. Conformations of key residues Met<sup>45</sup> and Thr<sup>1</sup> are shown from crystal structures with peptidic inhibitors (bortezomib, green; BSc4999, red) and the nonpeptidic indolo-phakelline inhibitor (purple).

To gain detailed insights in the nature of the Met<sup>45</sup> flexibility depending on the size of the P1 residue (**1** and **2**), we performed a set of molecular dynamics simulations based on the crystal structure of the native yeast 20S proteasome (Scheme 1c). As expected, the side chain of Met<sup>45</sup> shows a high flexibility in absence of any ligand with an RMSD in the range of 2 to 6 Å. The simulation using the methyl derivative **2** was characterized by a switch between two stabilized states referring to the two distinct conformers of Met<sup>45</sup> as observed in the crystal structures. The in vitro testing of inhibitors derived from **1** with iteratively enlarged P1 residues (2–4; Scheme 1a) allowed a correlation between the size of a residue in the S1

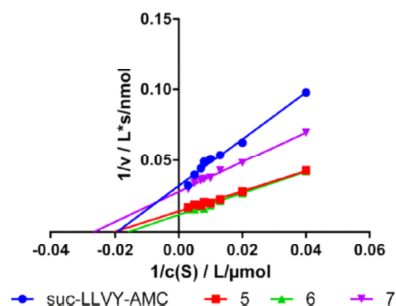
B

DOI: 10.1021/acschembio.6b00023  
 ACS Chem. Biol. XXXX, XXX, XXX–XXX



pocket and the resulting inhibitory activity. The length of the respective P1 residue has a direct influence on the dihedral angle  $\alpha$  of Met<sup>45</sup> as shown in Scheme 1b. The experimental determination of  $\beta 5$ -specific IC<sub>50</sub> values revealed a continuous increase of the inhibitory activity from P1 = methyl (IC<sub>50,  $\beta 5$</sub>  = 987 nM) via ethyl (IC<sub>50,  $\beta 5$</sub>  = 362 nM) to *n*-propyl (IC<sub>50,  $\beta 5$</sub>  = 219 nM) residues. While large P1 residues strengthen the inhibition by fixing the inhibitor in a specific receptor conformation, we questioned how this mechanism influences substrate hydrolysis.

Therefore, we used a substrate-based approach to identify Michaelis–Menten parameters of substrate conversion. We synthesized fluorogenic 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) substrates (5–7; Scheme 1a, see SI for details), based on the original structure of 1 with iteratively elongated P1 residues. Experimental determination of the Michaelis constant  $K_M$ , the turnover rate  $k_{cat}$ , the maximum reaction velocity  $V_{max}$ , and the specificity constant ( $k_{cat}/K_M$ ) was used to quantify the impact of a substrate-induced widening of the dihedral angle  $\alpha$  of Met<sup>45</sup> on the  $\beta 5$  activity. To determine the kinetic properties of 5–7 and the widely used reference substrate for the ChT-like activity Suc-LLVY-AMC, we fluorometrically determined the respective initial velocities of the substrate cleavage dependent on the substrate concentration and analyzed the data via the Lineweaver–Burke plot (Figure 2).  $K_M$  can be interpreted as



**Figure 2.** A double reciprocal Lineweaver–Burke plot of substrates 5–7 and Suc-LLVY-AMC. Each experiment was performed as quintuples in two independent measurements ( $n = 10$ ).

the dissociation constant of the enzyme/substrate complex if the formation and dissociation step is much faster than product formation and thus describes the affinity of a substrate to the active site.<sup>15</sup> For all four substrates, the observed  $K_M$  values were found to be in a similar range from 40  $\mu$ M for the propyl substrate 7 to 61  $\mu$ M for the ethyl substrate 6. This implies that all substrates, although they have a P1 length distribution from methyl over propyl to tyrosyl, share a similar affinity for the active site without any observable correlation of the P1 length and  $K_M$ , which is attributed to the flexibility of the Met<sup>45</sup> side chain. This flexibility may be able to shape a perfect S1 binding pocket for a variety of hydrophobic P1 residues. Substrates 5 and 6 with small P1 residues showed a 2-fold increase of  $V_{max}$  and  $k_{cat}$  compared to the substrates 7 and Suc-LLVY-AMC with bulky P1 side chains, which are caught in the mouse trap-like mechanism. This trend is also clearly demonstrated by the decrease of the specificity constant  $k_{cat}/K_M$ , which is a robust descriptor identifying the best substrate for a given enzyme.<sup>16</sup>

These findings contradict the postulated and so far unquestioned ChT-like activity of the  $\beta 5$  subunit. Following the ChT-like activity, the kinetic activation due to hydrophobic

interactions of a substrate, and the Met<sup>45</sup> side chain, the turnover rate ( $k_{cat}$ ) and the maximum reaction velocity ( $V_{max}$ ) should increase with a growing P1 residue as increasing affinity is also observed for inhibitors. As a logical consequence, substrates with bulky hydrophobic or aromatic P1 residues were expected to be much better substrates than the methyl substrate 5. Since substrates require a relatively high  $k_{off}$  rate to refresh the catalytic site, the swapped, non-native receptor conformation ( $\alpha = -174^\circ$ ) is only favorable for inhibitors, whereas the near-native state ( $\alpha = 48^\circ$ ) should be favorable for substrate conversion.

Thus, we conclude that the  $\beta 5$  subunit of the constitutive 20S proteasome favors a “small neutral amino acid preferring” (SNAAP) or “elastase-like” (E-like) over the ChT-like activity, and the classification should be expanded. The SNAAP or E-like activity of the 20S proteasome reported here was actually observed by Orlowski *et al.* in 1993 but at that time referred to an additional and unidentified active subunit.<sup>17</sup> Despite a report that the  $\beta 7$  subunit might be responsible for the SNAAP activity, which was not experimentally confirmed and presumed from structural data of the bovine 20S proteasome only, it was shown by mutational studies that any observed substrate cleavage is realized by the  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , or  $\beta 5$  subunits.<sup>18–20</sup> In these studies, the identification of the SNAAP-responsible active site was not definite since it seemed to depend on the substrate sequence around a potential cleavage site and thus was assigned to all three active subunits.

The recently published structure of the murine immunoproteasome permits a new explanation of why the  $\beta 5$  subunit is responsible for this E-like activity. In immunoproteasomes, the  $\beta 5$  subunit ( $\beta 5i$ ) harbors a structurally different S1 pocket compared to its constitutive counterpart ( $\beta 5c$ ).<sup>20</sup> In  $\beta 5c$ , the Met<sup>45</sup> side chain is flexible and points to the substrate binding channel, whereas in  $\beta 5i$  it is oriented toward Gln<sup>53</sup> engaged in strong van der Waals interactions. In  $\beta 5c$ , this Gln<sup>53</sup> residue is replaced by Ser, which cannot stabilize this orientation of Met<sup>45</sup> and thus leads to a much smaller S1 binding pocket. Because of the Met<sup>45</sup> flexibility, substrates with bulky P1 residues are able to reach the active site, but their hydrolysis is disfavored compared to substrates bearing a small hydrophobic side chain on this position. This discrimination may be due to major structural changes of the protein backbone that are necessary to enlarge the S1 pocket.<sup>21</sup> Substrate hydrolysis requires fast and dynamic structural changes, as the initial state has to be restored after every cleavage event. This induced fit may be beneficial for inhibiting the  $\beta 5$  active site in an irreversible or slowly reversible manner but hinders substrate clearance from the active site. This explains the experimental finding that inhibitors with iteratively enlarged P1 residues show increased inhibitory activities, whereas the velocity of hydrolytic cleavage of respective substrates with identical peptidic backbones decreases.

Additionally, the examination of the Lineweaver–Burke plots also brought to our attention a slight deviation from a strictly linear behavior for the propyl substrate 7 and more significantly for the reference substrate Suc-LLVY-AMC (Table 1).

One feasible explanation for this anomaly is the participation of at least one additional active site to contribute to the substrate cleavage. In a subsequent analysis, this “leakage” for 7 and Suc-LLVY-AMC was investigated by silencing the catalytic  $\beta 5$  subunit selectively. The 20S proteasome was preincubated with a high concentration (500 nM, about 10-fold IC<sub>50</sub>) of inhibitor 1. It is noteworthy that the aldehyde inhibitor 1 shows

C

DOI: 10.1021/acschembio.6b00023  
ACS Chem. Biol. XXXX, XXX, XXX–XXX

**Table 1. Key Parameters of Substrate Conversion As Determined by Lineweaver–Burk Plot and Residual Activity of Different Substrates after Silencing the  $\beta 5$  Subunit**

	5	6	7	Suc-LLVY-AMC
$K_M$ ( $\mu M$ )	45.1	61.7	39.4	49.7
$V_{max}$ ( $nM \cdot s^{-1}$ )	70.8	85.3	37.8	31.5
$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	49.6	59.7	26.5	22.1
$K_{cat}/K_M$ ( $L \cdot \mu mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )	1.1	1.0	0.7	0.4
residual activity (%)	0.5	0.4	1.2	12.0

no significant inhibitory activity against any other active site than  $\beta 5$  (see Supporting Information Figure 1). The hydrolytic activity dropped dramatically for 5 (0.5% of control) and 6 (0.4%), indicating that these substrates are exclusively cleaved by the  $\beta 5$  subunit. Substrate 7 showed a slightly higher remaining hydrolytic cleavage after the  $\beta 5$  knockout of 1.2%, which may be the reason for the observed deviation from a strict linear Lineweaver–Burke plot. Surprisingly, the reference substrate Suc-LLVY-AMC, which is used in the majority of  $\beta 5$  activity assays, showed a remaining activity of 12% using the same conditions. This is consistent with the obvious nonlinear behavior of the Lineweaver–Burke plot and questions the wide use of this substrate in proteasome assays. The analogue experiments performed with epoxomicin led to similar results with slight variations in residual activity due to a less favorable selectivity profile (see Supporting Information Table 3).

These findings are in accordance with the occasional use of the substrate Ac-WLA-AMC, which has been reported to be preferentially hydrolyzed by the  $\beta 5c$  subunit, instead of Suc-LLVY-AMC in recent studies.<sup>22</sup>

Based on these results, it becomes obvious that the inverse correlation of inhibition and hydrolysis strength arises from the same phenomenon. Reversible inhibitor binding can be defined by the ratio  $K_i = k_{off}/k_{on}$ ; thus the mouse trap analogy implies an increased *on* rate (depicted as the “cheese trigger”) as well as a decreased *off* rate (“caught by trap”) if activated by large residues. Use of this mechanism is especially valuable for the development of potent irreversible or slowly reversible binding inhibitors and actually has been applied unknowingly. The native state which is only accessible using small substituents at P1 leads to the opposite findings, which can be classically described by the Michaelis–Menten approach. Increasing P1 residues lead to increased hydrophobic interactions in S1, thus strengthening inhibition as well as the corresponding substrate affinity quantified by  $K_M$ . Due to the activation of the mouse trap, substrate dissociation is hindered, leading to a lower turnover number  $k_{cat}$ . This exemplifies that  $K_M$  values solely can, at least in some cases, not describe substrate conversion preferences of enzymes appropriately. Mechanistic comparability of inhibition and hydrolysis is particularly warranted as both events involve covalent addition to the catalytic Thr<sup>1</sup>.

Unselective cleavage of the established reference substrate may be critical when Suc-LLVY-AMC is used to rank the selectivity and potency of inhibitors for the  $\beta 5$  subunit. For this reason, substrate 5, Z-Leu-Asp(OtBu)-Ala-AMC, is preferable for these applications, and the replacement of Suc-LLVY-AMC by 5 is recommended.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acscchembio.6b00023.

Synthesis, molecular dynamics simulation, *in vitro* proteasome assays, compound characterization data, and references (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: schmidt\_boris@t-online.de.

### Author Contributions

<sup>†</sup>These authors contribute equally to this work.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Germany (GRK1657) and by the Hans und Ilse Breuer Stiftung.


## ■ REFERENCES

- (1) Hershko, A.; Leshinsky, E.; Ganoh, D.; and Heller, H. (1984) ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 1619–1623.
- (2) Borissenko, L., and Groll, M. (2007) 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem. Rev.* **107**, 687–717.
- (3) Driscoll, J., Brown, M. G., Finley, D., and Monaco, J. J. (1993) MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* **365**, 262–264.
- (4) Voorhees, P. M., Dees, E. C., O’Neil, B., and Orlowski, R. Z. (2003) The Proteasome as a Target for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **9**, 6316–6325.
- (5) Kortuem, K. M., and Stewart, A. K. (2013) Carfilzomib. *Blood* **121**, 893–897.
- (6) Kane, R. C., Farrell, A. T., Sridhara, R., and Pazdur, R. (2006) United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin. Cancer Res.* **12**, 2955–2960.
- (7) Meiners, S., Ludwig, A., Stangl, V., and Stangl, K. (2008) Proteasome inhibitors: Poisons and remedies. *Med. Res. Rev.* **28**, 309–327.
- (8) Braun, H. A., Umbreen, S., Groll, M., Kuckelkorn, U., Mlynarczuk, I., Wigand, M. E., Drung, I., Kloetzel, P.-M., and Schmidt, B. (2005) Tripeptide Mimetics Inhibit the 20 S Proteasome by Covalent Bonding to the Active Threonines. *J. Biol. Chem.* **280**, 28394–28401.
- (9) Zang, M., Li, Z., Liu, L., Li, F., Li, X., Dai, Y., Li, W., Kuckelkorn, U., Doeppner, T. R., Hermann, D. M., Zhou, W., Qiu, L., and Jin, F. (2015) Anti-tumor activity of the proteasome inhibitor BSc2118 against human multiple myeloma. *Cancer Lett.* **366**, 173–181.
- (10) Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463–471.
- (11) Voss, C., Scholz, C., Knorr, S., Beck, P., Stein, M. L., Zall, A., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P.-M., Groll, M., Hamacher, K., and Schmidt, B. (2014)  $\alpha$ -Keto Phenylamides as P1’-Extended Proteasome Inhibitors. *ChemMedChem* **9**, 2557–2564.
- (12) Groll, M., Schellenberg, B., Bachmann, A. S., Archer, C. R., Huber, R., Powell, T. K., Lindow, S., Kaiser, M., and Dudler, M. (2008) A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature* **452**, 755–758.

D

DOI: 10.1021/acscchembio.6b00023  
ACS Chem. Biol. XXXX, XXX, XXX–XXX





---

Theresa Neumann  
De-Bary-Straße 13  
60320 Frankfurt


18.07.2016

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---

*(Theresa Neumann)*



---

Theresa Neumann  
De-Bary-Straße 13  
60320 Frankfurt

18.07.2016

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

---

*(Theresa Neumann)*

# Lebenslauf



<b>Name:</b>	Theresa Neumann
<b>Geburtsdatum:</b>	03. Juni 1988
<b>Geburtsort:</b>	Fürth (i. By.)
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	deutsch
<b>Familienstand:</b>	ledig, keine Kinder

## BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

---

<b>06/2013 - 06/2016</b>	Wissenschaftlicher Mitarbeiterin der TU Darmstadt, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Prof. Dr. B. Schmidt
<b>09/2011 – 02/2011</b>	Praktikum bei der MERCK KGaA, Darmstadt Abteilung für Medizinische Chemie Darmstadt (Dr. B. Cezanne)

## HOCHSCHULSTUDIUM

---

<b>06/2013 - heute</b>	Promotion (Dr. rer. nat.) an der TU Darmstadt, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Prof. Dr. B. Schmidt
<b>04/2011 - 04/2013</b>	Chemiestudium (Master of Science Chemie) an der TU Darmstadt, Schwerpunktfach: Organische Chemie, Hauptfächer: Biochemie und Anorganische Chemie

---

Thema der Thesis: „*Synthese von Kinase-Inhibitoren der GSK-3 und von dem Tau-Aggregationshemmer BSc3094.*“

Betreuer der Thesis: Prof. Dr. Boris Schmidt, Institut für Organische Chemie und Biochemie.

**Abschluss: Master of Science**

**10/2007 - 09/2010**

Chemiestudium (Bachelor of Science Chemie) an der Universität Bayreuth

Thema der Thesis: „*Synthese des Sesquiterpens Albicanylacetat.*“

Betreuer der Thesis: Prof. em. Dr. Karlheinz Seifert, Lehrstuhl für Organische Chemie I/2.

**Abschluss: Bachelor of Science**

### **STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN**

---

**2008 - 2010**

Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Physikalische Chemie II der Universität Bayreuth (Prof. Dr. Andreas Fery)

**2008**

Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Anorganische Chemie II der Universität Bayreuth (Prof. em. Dr. Helmut Alt)

### **SCHULAUSBILDUNG**

---

**09/2005 - 07/2007**

Oberstufe, Gymnasium Hilpoltstein, Hilpoltstein.

Leistungskurse: Chemie und Geschichte.

**Abschluss: Allgemeine Hochschulreife**

**09/1998 - 08/2005**

Gymnasium Roth, Roth.